

Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Basel

von

Annemarie Bürgin-Wolff

aus Basel

~~1957~~

1959

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag der Herren Professoren

Dr. M. Geiger-Huber

Dr. O. Schüepp

Basel, den 5. Februar 1957.

Prof. Dr. W. Becker

Dekan

Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»

1959, Band 69

(Als Sonderdruck ausgegeben am 4. September 1959)

Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Basel

von

Annemarie Bürgin-Wolff

aus Basel





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien

Von Annemarie Bürgin-Wolff

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 19. Mai 1959

Inhalt	Seite
Einleitung	75
Methode	77
I. Aseptische Aufzucht der Wurzelsysteme der Versuchspflanzen mit ständigen Sterilitätskontrollen	77
II. Kultivierung der Rhizobien	82
III. Impfen der Versuchspflanzen	82
Experimentelle Ergebnisse	83
I. Infektion von Leguminosen durch Rhizobien am Beispiel von <i>Pisum sativum</i> L., <i>Medicago sativa</i> L., <i>Trifolium pratense</i> L. und <i>Trifolium subterraneum</i> L.	83
1. Infektionsweg	83
2. Infektionsrate in Abhängigkeit von der Versuchsdauer	92
3. Relation zwischen der Anzahl der Infektionen und der Anzahl der Knöllchen	94
4. Lokalisation der Knöllchen	96
5. Bedeutung des Sprosses für die Infektion	97
6. Einfluß von Nitrationen auf die Infektion	101
7. Untersuchungen über die Infektion von <i>Pisum sativum</i> durch <i>Rhizobium trifolii</i>	104
II. Untersuchungen über die Infektion von Nichtleguminosen durch Rhizobien am Beispiel von <i>Helianthus annuus</i> L. und <i>Zea Mays</i> L.	105
Zusammenfassung	107
Literatur	109

Einleitung

Die Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien ist durch folgende Vorgänge gekennzeichnet: Die Bakterien dringen durch die Wurzelhaare (Beijerinck, 1888 usw.) und, wo diese fehlen, durch die Epidermis (Schaede, 1940) oder durch Wunden und an Seitenwurzelanlagen (Allen und Allen, 1940; Arora, 1954; Mc Coy, 1929) in das Wurzelinnere ein. Sie regen, wahrscheinlich durch Ausscheiden von Wirkstoffen (Thimann, 1936, 1939) die Rindenzellen zu lokalen Zellteilungen an: Es entsteht eine Gewebswucherung, das Knöllchen. Die im Knöllchengewebe lokalisierten Bakterien vermehren sich stark, verändern unter der

Einwirkung des Cytoplasmas der Wirtspflanze ihre Gestalt und haben die Fähigkeit, den Luftstickstoff zu binden, allerdings nur, wenn im Knöllchen das rote Pigment Leghaemoglobin enthalten ist (Virtanen, 1947; Virtanen et. al., 1947). Eine gute Übersicht über diese Vorgänge geben Schaede (1948) sowie Allen und Allen (1958). Bei der Leguminosensymbiose mit Rhizobien sind daher drei wesentliche Phasen auseinanderzuhalten: die *Infektion*, die *Knöllchenbildung* und die *Stickstoff-Assimilation*.

Es ist bekannt, daß unter besonderen Bedingungen, z. B. bei hoher Konzentration an Nitraten im Boden oder in der Nährlösung oder bei der Unterbindung der CO_2 -Assimilation durch Dunkelheit oder Entfernen der assimilierenden Organe, die Knöllchenbildung unterbleibt (Thornton und Nicol, 1936; Diener, 1950; Gäumann, 1951; Rudin, 1956). Schon verschiedentlich wurde versucht, das Ausbleiben der Knöllchenbildung zu erklären. Die meisten Erklärungsversuche überzeugen jedoch nicht, weil dabei Infektion und Knöllchenbildung nicht konsequent auseinandergehalten werden. Wohl ist die Infektion *Voraussetzung* der Knöllchenbildung, doch braucht nicht jede Infektion zur Knöllchenbildung zu führen. Bevor man versucht, das Ausbleiben der Knöllchenbildung zu erklären, muß daher geprüft werden, ob im gegebenen Fall die Infektion oder die Reaktion des Wirtes auf die Infektion ausgeblieben ist. Schon Schaede (1948) empfiehlt beim Fehlen der Knöllchenbildung nicht gleich von ausgebliebener Infektion zu sprechen. Wahrscheinlich liegt in der ungenügenden Unterscheidung oder gar Verwechslung von Infektion und Knöllchenbildung öfters die Ursache, weshalb die Erklärungsversuche für das Ausbleiben der Knöllchen so weit voneinander abweichen.

Ebenfalls ungelöst ist das Problem, warum nur Leguminosen mit Rhizobien Knöllchen bilden (Nutman, 1956; Allen und Baldwin, 1954; Allen und Allen, 1958), und wie die Spezifität einer bestimmten Leguminosenart zu einer bestimmten Bakterienrasse zu erklären ist (Rippel-Baldes, 1952). Auch bei der Beschreibung *dieser* Tatsachen wird meistens das Ausbleiben der Knöllchenbildung mit dem Fehlen der Infektion identifiziert. Erklärungsversuche verlangen auch hier, daß zunächst geprüft wird, ob überhaupt eine Infektion stattgefunden hat und wenn ja, wann und wo der Weg der normalen Knöllchenbildung wieder verlassen wird, d. h. welche Vorgänge sich dabei im Innern der Wurzel abspielen.

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob es beim Fehlen der Knöllchenbildung in den oben geschilderten Fällen zu der ersten Phase der Symbiose, der Infektion, gekommen ist. Um Vergleiche ziehen zu können, mußten die Verhältnisse der Infektion bei Leguminosen zuerst unter solchen Bedingungen abgeklärt werden, welche eine reichliche Knöllchenbildung ermöglichen.

Methode

I. Aseptische Aufzucht der Wurzelsysteme der Versuchspflanzen mit ständigen Sterilitätskontrollen

Die zur Lösung unseres Problems gewählte Methode besteht darin, durch *aufeinanderfolgende mikroskopische Kontrolle* Wurzelhaare lebender Wurzelteile auf allfällige Infektionen durch Rhizobien zu untersuchen. Obwohl Bakterien morphologisch nicht unterscheidbar sind, muß völlige Sicherheit bestehen, daß alle beobachteten, die Wurzelhaare infizierenden Bakterien tatsächlich Rhizobien sind. Es war daher nötig, *sterile Wurzelsysteme* zu züchten und sie mit *Reinkulturen* von Rhizobien zu impfen. Um durch andere Mikroorganismen verunreinigte Versuchspflanzen von der Untersuchung ausschließen zu können, wurde eine Methode ausgearbeitet, die erlaubt, die Sterilität der Wurzelsysteme vor der Impfung zu prüfen. Um Zeit und Material zu sparen, sollte die Methode ferner gestatten, nach jedem Arbeitsgang, welchen die aseptische Aufzucht höherer Pflanzen erfordert, in besonderen Kontrollversuchen allfällig erfolgte Fremdinfectionen feststellen zu können. Wegen der unterschiedlichen Verunreinigung der Samen mit Mikroorganismen mußten die Sterilitätskontrollen (p.80ff) für jeden *einzelnen* Versuch durchgeführt werden. Auch sind bei der Aufzucht so viele Manipulationen erforderlich, daß trotz sorgfältigster Arbeit und großer Übung die Gefahr neuer Verunreinigungen besteht. Um sie auf ein Minimum zu reduzieren, wurden alle Arbeitsgänge, bei denen die Keimpflanzen aus den sterilen Kulturgefäßen herausgenommen werden müssen, so rasch wie möglich durchgeführt. Alle Manipulationen wurden deshalb nach einem festgelegten Arbeitsplan in der mit Formol und U.V.-Licht desinfizierten Impfkammer von zwei aufeinander eingespielten mit Mundschutz und Kopftuch arbeitenden Personen vorgenommen.

Als Versuchspflanzen dienten: *Pisum sativum* L., Sorte «Senator»; *Trifolium pratense* L., Sorte «Eiffeler»; *Medicago sativa* L., Sorte «Lucerne de Provence»; *Trifolium subterraneum* L. (von Dr. Nutman, Rothamsted Experimental Station); *Zea Mays* L., Sorte «Gelber Rheintaler»; *Helianthus annuus* L.

Für die Versuche wurden ausschließlich Samen verwendet, die weder Flecken noch Risse, beides mögliche Infektionsherde, in der Samenschale aufwiesen, wobei kleinere Samen, wie die von Rotklee und Luzerne, mit dem Binokular geprüft wurden. Außerdem wurde der Fruchtsiel der Maiskörner, nach Burlet (1940) der Hauptinfektionsherd, mit einer kleinen, spitzen Flamme ausgeglüht.

Für große und kleine Samen mußten verschiedene Aufzuchtmethoden angewandt werden.

1. Große Samen und Früchte

a) Desinfizieren und Quellen

Die großen Früchte und Samen (*Zea Mays*, *Helianthus annuus*, *Pisum sativum*) wurden nach der von Burlet (1940) angegebenen Methode gewaschen, desinfiziert und gequollen, wobei als Desinfektionsmittel Brom und zum Quellen der von ihm beschriebene Quellapparat verwendet wurde.

Die nachstehende Aufstellung gibt Aufschluß über Bromkonzentrationen und Einwirkungszeiten, die Desinfektion der Samen im allgemeinen gewährleisteten, ohne die Keimfähigkeit zu beeinträchtigen. Die angegebenen Zahlen sind jedoch bei neuen Versuchen der Bromempfindlichkeit und der Verunreinigung des jeweils verwendeten Samengutes anzupassen.

Samen	Bromkonzentration	bei einer Einwirkungszeit von
<i>Pisum sativum</i>	1:700	1 $\frac{3}{4}$ Std.
<i>Helianthus annuus</i>	1:250	2 Std.
<i>Zea Mays</i>	1:500	2 Std.

Nach der Desinfektion blieben Mais, Erbsen und Sonnenblumen während 24 Stunden im Quellapparat. Trotz der wirksamen Desinfektionsmethode, die bei vielen Versuchen zu vollkommener Sterilität der Samenoberfläche führte, kam es hin und wieder vor, daß sich einzelne, einige Male sogar alle für einen Versuch bestimmte Samen als infiziert erwiesen. Schon Stolp (1952) stellte fest, daß 30 bis 40% der von ihm verwendeten Erbsen im Sameninnern infiziert waren; er nahm an, daß die Bakterien, die nach seinen Untersuchungen zwischen Samenschale und Kotyledonen lokalisiert waren, bei der Keimung nach außen gelangten und die zuvor äußerlich sterilen Samen neu infizierten. Nach der von ihm entwickelten, sehr einfachen und praktischen Methode (Stolp, 1952) wurde auch das hier verwendete Samenmaterial auf *innere Sterilität* geprüft. In drei Versuchen mit Erbsen, deren Oberflächensterilität zuvor festgestellt worden war, wurden je bei 7,5%, 6,5% und 7,6% der Samen innere Infektionen gefunden, während gleichbehandelte Maiskörner eine Infektionsrate von 18,6% aufwiesen. Dies erklärt, warum trotz einer zuverlässigen, äußerlichen Desinfektion immer wieder Fremdinfectionen auftreten.

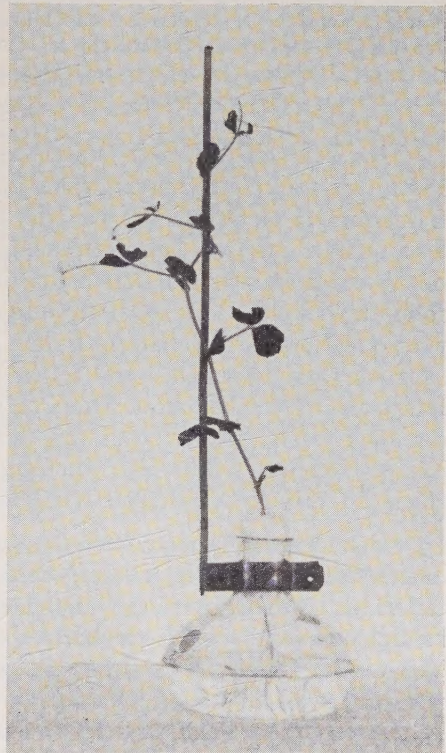
Um die gegenseitige Ansteckung der Samen resp. Früchte durch die bei der Keimung eventuell aus dem Sameninnern frei werdenden Bakterien zu verhindern, wurde nach einer Quelldauer von nur 24 Stunden vor dem Durchbruch der Keimwurzel jeder Same resp. Frucht einzeln auf ein Keimröhrchen gesetzt.

Als Keimröhrchen wurden zum Aufliegen des Samens oberhalb der Mitte verengte, mit 10 cm³ Wasser gefüllte und mit einem Wattedropfen verschlossene Reagenzröhrchen (Rudin, 1956) verwendet.

b) *Die aseptische Aufzucht der Wurzelsysteme der Versuchspflanzen bei ständigen Sterilitätskontrollen*

Die einzeln in sterile Keimröhrchen gesetzten Samen resp. Früchte wurden fünf bis sechs Tage im Dunkeln bei konstanter Temperatur von

Figur 1
Pisum sativum in Knopscher Nährlösung
(drei Wochen alt)



28° C gelassen. Sobald die Wurzel der Keimlinge etwa 8 cm und der Sproß 2 bis 4 cm lang war, wurden sie aseptisch auf sterile, 200 cm³ Nährlösung enthaltende Fernbachkolben gesetzt (vgl. Fig. 1). Dabei wurden Wurzelhals und unterster Sproßteil der Pflanzen in sterile Watte gewickelt, mit der der Kolben verschlossen und der Keimling gehalten wird (Rudin, 1956).

Sofern nichts anderes angegeben wird, wurden die Pflanzen in einer stickstofffreien Nährlösung aufgezogen: 1 g CaCl₂; 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O; 0,068 g KH₂PO₄; 0,261 g K₂HPO₄; 0,25 g KCl; 3 Tropfen einer 5 %-FeCl₃-Lösung; 1 cm³ der Hoaglandschen A-Z-Lösung, was mit reinstem Wasser (im Gemischtbettverfahren durch Ionenaustauscher gereinigtes

Wasser mit spezifischer Leitfähigkeit $> 4 \cdot 10^6 \Omega$) zu einem Liter aufgefüllt wurde. Die Nährlösung wurde in oft gebrauchte Fernbachkolben aus Jenaerglas eingefüllt und im Autoklaven 30 Minuten bei 1 atü sterilisiert. Beim Sterilisieren der neutralen Nährlösung entsteht ein ziemlich starker Niederschlag von Kalziumphosphat, der, da er sich am Wurzelsystem der Pflanzen in lockeren Wolken festsetzt, bei der mikroskopischen Betrachtung der Wurzelhaare sehr stört. Um den Niederschlag auf ein Minimum zu reduzieren, wurde der Nährlösung vor dem Sterilisieren nur das *primäre* Phosphat beigegeben, während das *sekundäre* nach dem Sterilisieren jedem Kolben einzeln, in 3 cm³ aqua dest. gelöst, aus einem in den Verschlupfropfen gewickelten Anhang durch leichtes Neigen des Kolbens beigelegt wurde. So kann die Nährlösung neutralisiert werden, ohne daß der Kolben geöffnet werden muß. Die Niederschlagsbildung wird allerdings nur dann vermindert, wenn die Neutralisation sehr langsam unter ständigem Schütteln des Kolbens vor sich geht. Das pH der Nährlösung ist vor dem Sterilisieren 4,5 und nach dem Neutralisieren 6,7. Der Wattepfropf mit dem Anhang wird beim Setzen der Pflanzen durch den den Keimling haltenden ersetzt.

Die Wurzeln, die viele Wurzelhaare entwickeln, tauchen in die Nährlösung ein und bleiben steril, wenn das Setzen sorgfältig erfolgte und das Sameninnere nicht infiziert war; der Sproß wächst außerhalb des Kolbens, also unsteril, weiter. Die Fernbachkolben wurden, da direkte Belichtung des Wurzelsystems die Knöllchenbildung herabsetzt, mit einer Aluminiumfolie umwickelt (Rudin, 1956) und im Gewächshaus bei einer Temperatur von 17 bis 26° C gehalten. In den Herbst- und Wintermonaten wurden sie zusätzlich zwischen 6 und 9 Uhr und 17 und 21 Uhr mit Fluoreszenzlampen künstlich belichtet. Eine Prüfung ergab eine gute Übereinstimmung der spektralen Zusammensetzung des Zusatzlichtes mit dem Sonnenlicht. Die so belichteten Pflanzen wuchsen ausgezeichnet, was sich auch in der sogar im Winter reichlichen Knöllchenbildung zeigte.

Um Zeit zu sparen und etwaige Fehler in der Arbeitsweise rasch ausmerzen zu können, war es wichtig, in jedem Versuchsstadium beurteilen zu können, ob eine Versuchsserie durch Mikroorganismen verunreinigt und somit der Versuch abzubrechen war. Es war jedoch schwierig, Verunreinigungen *direkt* ohne mikroskopische Kontrolle festzustellen, weil die langsame Vermehrung der etwa an den Samen verbliebenen Bakterien oder Pilze in den Keimröhrchen ein Erkennen erschwerte. Waren die Pflanzen in die Kolben gebracht worden, so konnten etwa verbliebene und sich langsam vermehrende Mikroorganismen wegen der unvermeidbaren Trübung der Nährlösung nur schwer gesehen werden. Es war daher eine Methode zu finden, die auf indirektem Weg in jedem Stadium des Versuchs einen sicheren Schluß auf die Sterilität der Pflanzen zuließ.

Um dies zu erreichen, wurden nach der Desinfektion der Samen etwa ein Drittel bis ein Viertel (meist 20 bis 30) der für einen Versuch bestimmten Samen willkürlich ausgelesen und einzeln in «Kontrollröhrchen», (Nährbouillon enthaltende Reagenzröhrchen) gebracht, während nur der Rest zur Aufzucht auf die «Keimröhrchen» gesetzt wurde.

Die Kontrollversuche mußten so angelegt werden, daß möglichst viel verschiedene der etwa noch am Samen verbliebenen Mikroorganismen erfaßt werden konnten. Es wurde deshalb eine Nährlösung gesucht, in welcher sich möglichst viele Arten von Pilzen und Bakterien vermehren können. Nach vielen Versuchen, bei denen die Zusammensetzung der Bouillon und die Konzentration von Bierwürze variiert wurde, schien folgende Nährlösung der Aufgabe am besten zu entsprechen: 5 g Zucker, 1 g Liebig's Fleisch-extrakt, 0,25 g Pepton wurden mit Wasser zu 1 l aufgefüllt und mit NaOH neutralisiert ($pH = 7$). Der beim Sterilisieren im Autoklaven entstehende Niederschlag wurde durch Talk abfiltriert, da man in einer von vorneherein trüben Bouillon Infektionen nicht ohne mikroskopische Untersuchung erkennen könnte. Die die Bouillon enthaltenden Röhrchen wurden noch einmal 30 Minuten im Autoklaven bei 1 atü sterilisiert.

War die Desinfektion ungenügend, so vermehrten sich die am Samen haftenden Organismen in den Kontrollröhrchen in wenigen Tagen so stark, daß Bakterien an der Trübung der Bouillon und Pilze am Myzelwachstum erkannt werden konnten. Blieben mehr als zwei Kontrollröhrchen nicht steril, so wurde angenommen, daß auch die eigentlichen Versuchspflanzen in den Keimröhrchen verunreinigt waren, worauf der Versuch abgebrochen wurde; umgekehrt wurde auf Sterilität der Versuchspflanzen geschlossen, wenn nicht mehr als zwei der 20 bis 30 Kontrollröhrchen infiziert waren.

In gleicher Weise wurde der zweite Arbeitsgang, das aseptische Setzen der Samen auf Keimröhrchen, kontrolliert. Wiederum wurde willkürlich ein Viertel bis ein Drittel der in den Keimröhrchen gewachsenen Keimlinge (meist 20 bis 30) ausgewählt und in Bouillonröhrchen gebracht, während der Rest auf die Kolben gesetzt wurde. Zeigten sich nach sechs Tagen, während der die jungen Pflänzchen in den Kolben wuchsen, in den Kontrollröhrchen nicht mehr als zwei Infektionen, so wurde wiederum angenommen, daß das Versuchsgut steril geblieben war.

Beim dritten Stadium, bei dem zu kontrollieren war, ob die Pflanzen nach dem Setzen auf die Kolben steril geblieben waren, konnte die Nährlösung der Versuchspflanzen *direkt* geprüft werden. Mit einer sterilen Pipette wurde *jedem* Kolben Nährlösung entnommen, von der die eine Hälfte mit der beschriebenen, die Vermehrung von Mikroorganismen stark fördernden Bouillon gemischt wurde. Um jedoch bei dieser letzten und wichtigsten Kontrolle möglichst alle, die Pflanzen etwa verunreinigenden Mikroorganismen erfassen zu können, wurde neben der bisher verwendeten eine zweite, anders zusammengesetzte «Kontrollbouillon»¹ benutzt, der die andere Hälfte der dem Kolben entnommenen Nährlösung beigegeben wurde. Zeigte eines der beiden Kontrollröhrchen nach acht Tagen Infektionen, so wurde die entsprechende Pflanze von der Untersuchung ausgeschlossen. Blieben jedoch beide Kontrollröhrchen keimfrei, so durfte angenommen werden, daß sich in der rein anorganischen, N-freien Nährlösung im Kolben erst recht keine Mikroorganismen

¹ 5 g NaCl, 3 g Liebig's Fleischextrakt, 10 g Pepton, auffüllen auf 1 l Wasser, neutralisieren, sterilisieren, abfiltrieren wie oben.

entwickelt hatten. Es durfte daher die Aussage gewagt werden, daß die in dem betreffenden Versuchskolben wachsende Pflanze steril geblieben war.

2. Kleine Samen

Kleine Samen, wie jene von *Trifolium subterraneum*, *Trifolium pratense* und *Medicago sativa* wurden nach der Methode von Nutman (1949) mit konzentrierter Schwefelsäure desinfiziert, wobei *Trifolium pratense* und *Medicago sativa* 30 Minuten, die empfindlicheren Samen von *Trifolium subterraneum* nur 10 Minuten der Säurewirkung ausgesetzt wurden. Die Samen wurde so lange aseptisch gespült, bis sich beim Zusatz von BaCl_2 im Waschwasser kein Niederschlag mehr bildete. Daraufhin wurden sie, ohne vorheriges Quellen, aseptisch in Kulturröhrchen auf Agar gebracht (Thornton, 1930a). Alle Manipulationen wurden aseptisch mit sterilen Instrumenten in einem vorher desinfizierten Impfkasten (Burlet, 1940) ausgeführt.

II. Kultivierung der Rhizobien

Zum Impfen der Versuchspflanzen wurden folgende Stämme verwendet: *Rhizobium leguminosarum* Frank, Stamm H47, und *Rhizobium trifolii* Dangeard, Stamm MN 19, von Prof. Virtanen, Helsinki; *Rhizobium trifolii* Dangeard, Stamm S.U. 297/3, von Dr. Nutman, Rothamsted Experimental Station, und *Rhizobium meliloti* Dangeard, hier aus Knöllchen von *Medicago sativa* isoliert.

Die Bakterien wurden auf einem Hefe-Mannit-Nährboden von folgender Zusammensetzung kultiviert: 100 cm³ Hefewasser, 10 g Mannit, 0,2 g NaCl, 1 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g CaCO_3 , 900 cm³ Leitungswasser, 1,8% Agar. Der Nährboden reagiert neutral. Für die Herstellung des Hefewassers wurde 20 g frische Bäckerhefe in 200 cm³ Wasser suspendiert und 20 Minuten im Autoklaven bei 1 atü extrahiert. Vom Filtrat wurde die entsprechende Menge dem Nährboden beigegeben, der in Kolleschalen abgefüllt im Autoklaven 20 Minuten bei 1 atü sterilisiert wurde.

III. Impfen der Versuchspflanzen

Die Pflanzen wurden mit einer dicken Suspension von Rhizobien geimpft, die folgendermaßen hergestellt wurde: Unter Zugabe von 20 cm³ sterilem Wasser wurden die Bakterien in der Kolleschale vom Nährboden gelöst, in einen ebenfalls sterilen Erlenmeyerkolben umgegossen, der sofort geschlossen und dann tüchtig geschüttelt wurde. Mit einer sterilen Pipette wurde jedem der die Pflanzen enthaltenden Kolben 3 cm³ der Bakteriensuspension zugefügt, wobei für jede Pflanze eine frische Pipette verwendet wurde, um die Gefahr der Fremdinfection auszuschließen.

Experimentelle Ergebnisse

I. Infektion von Leguminosen durch Rhizobien am Beispiel von *Pisum sativum* L., *Medicago sativa* L., *Trifolium pratense* L. und *Trifolium subterraneum* L.

1. Infektionsweg

Die Bakterien dringen bei *Pisum*, *Trifolium* und *Medicago* sowie auch bei einigen andern Leguminosen durch die Wurzelhaare in das Wirtsgewebe ein (Beijerinck, 1888 usw.). In der Literatur wurde häufig beschrieben, daß sie im sogenannten Infektionsschlauch, einem von der

Figur 2

Lose, einzel auftretende Rhizobien in den Wurzelhaaren von *Pisum sativum*. Wegen der Bewegung der Bakterien und der geringen Tiefenschärfe der starken Objektive, ist es leider nicht möglich, die Bakterien, die beim direkten mikroskopischen Beobachten viel deutlicher hervortreten, schärfer abzubilden

(Aufnahme: Zeiß-Mikroskop,
Objektiv 90 ×, Phasenkontrast,
Okular 6 ×)



Wirtszelle ausgeschiedenen, Bakterien und Schleim umhüllenden Zellulosemantel, durch das Wurzelhaar in das Wurzelgewebe vordringen und die Wirtszellen zu Teilungen anregen (Prazmowski, 1890; Thornton, 1930a; Schaede, 1940, 1944; Fåhræus, 1957). Der Infektionsschlauch in den Wurzelhaaren ist also nach der Literatur das erste Kennzeichen einer erfolgten Infektion. Auf welche Weise die Bakterien die Zellwand der Wurzelhaare durchbrechen, und wie der Infektionsschlauch die Zellwände des Rindengewebes der Wurzel durchstößt, ist bis heute unbekannt. Im allgemeinen sind sich die Autoren darüber einig, daß sehr wenige Wurzelhaare infiziert werden; die Zahlenangaben schwanken zwischen weniger als 1% und 5% (Thornton, 1929a; McCoy, 1932; Diener, 1950; Fåhræus, 1957). Bei den vielen Untersuchungen für die vorliegende Arbeit an *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Trifolium pratense* ist es mir nur ein *einziges Mal* gelungen, einen Infektionsschlauch in einem Wurzelhaar zu finden, obwohl in ganz verschiedenen Stadien, vor und während der Knöllchenentwicklung, und an verschiedenen Orten des Wurzelsystems danach gesucht wurde.

Bei der mikroskopischen Untersuchung¹ der ungefärbten Wurzelhaare mit dem Phasenkontrastverfahren wurden jedoch mit einer gewissen Regelmäßigkeit lose, nicht gemeinsam umhüllte, also einzeln auftretende Bakterien in den Wurzelhaaren beobachtet, die entweder Brown'sche Bewegung zeigten oder sich rasch aktiv bewegten (vgl. Fig. 2). Auch Diener (1950) berichtet kurz über eine entsprechende Beobachtung. Keine Stellen des Wurzelsystems waren für Infektionen bevorzugt.

Tabelle 1

Anzahl der durch einzeln auftretende Rhizobien und der durch einen Infektionsschlauch infizierten Wurzelhaare bei *Medicago sativa*

A. Versuchsdauer: 24. Mai bis 12. Juli. Geimpft wurden 1 Monat alte Pflanzen. Die ersten winzigen Knöllchen waren am 10. Tag nach dem Impfen sichtbar. Beim Abbruch des Versuchs zeigten die Kontrollpflanzen normale Knöllchenbildung

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der durch einzelne Bakterien infizierten Wurzelhaare		Anzahl der durch Infektionsschläuche infizierten Wurzelhaare
		Anzahl	%	
10	100	5	5,0	0
13	1262	17	1,34	0
14	576	9	1,56	1 = 0,17 %
15	642	8	1,24	0
	2580	39	1,51	1

B. Versuchsdauer: 19. Juli bis 15. September. Geimpft wurden 8 Tage alte Pflanzen. 18 Tage nach dem Impfen war das erste Knöllchen sichtbar. Die Kontrollpflanzen wiesen beim Abbruch des Versuchs normale Knöllchenbildung auf

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der durch einzelne Bakterien infizierten Wurzelhaare		Anzahl der durch Infektionsschläuche infizierten Wurzelhaare
		Anzahl	%	
3	294	7	2,38	0
4	111	2	1,80	0
7	52	0	0	0
17	447	0	0	0
33	657	0	0	0
35	504	2	0,39	0
35	272	3	1,10	0
	2337	14	0,59	0

¹ Die mikroskopische Untersuchung der ungefärbten Wurzelhaare mit dem binokularen Phasenkontrastmikroskop (Wild M 20, Objektive: Fluotar 50×, 100×) wurde so durchgeführt, daß jeden Tag an einer neuen Pflanze zirka 1 cm lange Wurzelstücke an denjenigen Orten des Wurzelsystems abgeschnitten worden waren, an denen Knöllchenbildung prinzipiell möglich ist. Von diesen Wurzelstücken, die zwischen Objektträger und Deckglas in frisches Leitungswasser gebracht worden waren, wurden jeweils zirka 100 der dem Deckglas parallel liegenden Wurzelhaare mikroskopiert.

Bei allen Wurzelhaare tragenden Wurzelteilen bestand die gleiche Chance, Infektionen zu finden. In Tabelle 1 wird am Beispiel von *Medicago sativa* die Anzahl der durch einzelne Bakterien und der durch einen Infektionsschlauch infizierten Wurzelhaare dargestellt. Obwohl in diesen beiden Versuchen beinahe 5000 Wurzelhaare beobachtet wurden, konnten nur *ein* Infektionsschlauch, hingegen 53 durch einzelne Bakterien infizierte Wurzelhaare festgestellt werden. Die Anzahl der Rhizobien, die in einem Wurzelhaar gefunden wurde, schwankt zwischen einem einzigen Bakterium und so vielen, daß sie nicht mehr gezählt werden können, wobei eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür besteht, daß jeweils nur ein *Rhizobium* in ein Wurzelhaar eindringt und sich dort vermehrt. Tabelle 2 gibt am Beispiel der in Tabelle 1 angeführten 53 infizierten Wurzelhaare von *Medicago sativa* wieder, wie viele Bakterien jeweils in einem Wurzelhaar beobachtet wurden.

Tabelle 2

Anzahl der Rhizobien in den einzelnen Wurzelhaaren von *Medicago sativa*

Die angeführten Wurzelhaare sind identisch mit den in Tabelle 1 als infiziert angegebenen

13 Wurzelhaare enthielten je			1 Rhizobium	
14	»	»	»	2 Rhizobien
6	»	»	»	3 »
3	»	»	»	4 »
3	»	»	»	6 »
1	»	»	»	8 »
1	»	»	»	9 »
1	»	»	»	11 »
1	»	»	»	13 »
1	»	»	»	15 »
1	»	»	»	16 »
1	»	»	»	20 »
1	»	»	»	26 »
1	»	»	»	27 »
1	»	»	»	29 »
4	»	»	»	sehr viele, nicht mehr zählbare Rhizobien

Die schon beschriebene (vgl. Allen und Allen, 1958) und auch in diesen Versuchen häufig auftretende, starke Krümmung der Wurzelhaare läßt sich nicht in einen ursächlichen Zusammenhang mit der Infektion bringen, da die meisten der gekrümmten Wurzelhaare nicht infiziert waren und die die Bakterien enthaltenden sehr oft vollkommen gerade blieben.

Dank der geringen Tiefenschärfe der verwendeten starken Objektive kann konstatiert werden, ob sich die Bakterien *innerhalb* des Wurzelhaares befinden; die verschiedentlich festgestellte, starke aktive Beweglichkeit der Bakterien erleichtert die Entscheidung: Man sieht, wie die sich lebhaft bewegenden Rhizobien an die Zellwand stoßen und dann

ihre Bewegungsrichtung ändern, sich also im Innern des Wurzelhaares befinden müssen. Die Lokalisation der Bakterien wird außerdem aus folgender, einfach auszuführender Kontrolle ersichtlich: Man verursacht auf dem Objektträger während der mikroskopischen Beobachtung eine starke Strömung, indem man auf der einen Seite des Deckglases einen Wassertropfen zufügt und auf der andern das Wasser mit Filtrierpapier wegsaugt. Die die Wurzelhaare *umgebenden* Partikelchen oder Bakterien werden von der Strömung mitgerissen, während die Bewegungsrichtung der sich in den Haaren befindenden Bakterien nicht beeinflusst wird.

Bei der mikroskopischen Prüfung von, in *Gartenerde* gezogenen Luzernen (*Medicago sativa*) wurden ebenfalls regelmäßig Wurzelhaare beobachtet, die *einzelnen* auftretende Bakterien enthielten, was den Schluß zuläßt, daß diese Art der Infektion nicht nur bei der Kultivierung der Pflanzen auf Agar oder in Nährlösung eintritt. Untersuchungen von Rotklee (*Trifolium pratense*) ergaben das gleiche Resultat, d. h. es wurden nur durch einzelne Bakterien und nicht durch Infektionsschläuche infizierte Wurzelhaare beobachtet, und zwar auch nicht in Zonen mit stark verkrüppelten Wurzelhaaren. Allerdings wurden nur an wenigen von den vielen der mikroskopischen Prüfung unterzogenen Pflanzen die Wurzelhaare ausgezählt (vgl. Tabelle 3).

Im Gegensatz dazu wurden bei einer Rasse von *Trifolium subterraneum*, bei der reichliche Knöllchenbildung genetisch bedingt ist¹, nach

Tabelle 3

Anzahl der infizierten Wurzelhaare bei *Trifolium pratense*

Versuchsdauer: 20. Juli bis 30. November. Geimpft wurden 15 Tage alte Pflanzen. Die ersten Knöllchen traten 1 Monat nach dem Impfen auf. Beim Abbruch des Versuchs zeigten die Kontrollpflanzen normale Knöllchenbildung

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der durch einzelne Bakterien infizierten Wurzelhaare		Anzahl der durch Infektionsschläuche infizierten Wurzelhaare
		Anzahl	%	
4	150 ²	3	2.00	0
5	295 ²	2	0.67	0
25	890	3	0.33	0
65	221	4	1.80	0
	1556	12	1.2	0

¹ Nutman stellte fest, daß verschiedene Eigenschaften der Symbiose zwischen Rotklee und Rhizobien genetisch bestimmt sind, so z. B. frühe oder späte (1953) und reichliche oder spärliche Knöllchenbildung (1949, 1948).

Solche speziell herausgezüchtete, zu reichlicher Knöllchenbildung führende Samen von *Trifolium subterraneum* wurden mir samt den passenden Bakterien, *Rhizobium trifolii*, Stamm S. U. 297/3 von Dr. Nutman, Rothamsted Experimental Station, freundlicherweise zur Verfügung gestellt, dem ich an dieser Stelle herzlich dafür danke.

² Alle mit Wurzelhaaren besetzten Stellen untersucht.

der Impfung mit einem passenden Bakterienstamm Infektionsschläuche in größerer Anzahl gefunden (vgl. Fig. 3). Das Ergebnis des in Tabelle 4 dargestellten Versuches, bei dem täglich mehrere hundert Wurzelhaare ausgezählt worden waren, um eine eventuelle regelmäßige Lokalisation der Infektionsschläuche zu finden, läßt vermuten, daß es für die Bildung von Infektionsschläuchen bevorzugte Stellen gibt. Eine große Anzahl von Infektionsschläuchen fand sich in der Hauptsache bei zwei Pflanzen (vgl. 10. und 17. Untersuchungstag), bei denen in sechs Präparaten von je 1 cm Wurzellänge 34 bzw. 17 festgestellt worden waren. In drei der zwölf mikroskopierten Präparate, die von diesen beiden Pflanzen stammten, traten die Infektionsschläuche gehäuft auf (11 und 16 bzw. 14 Schläu-

Figur 3
 Infektionsschlauch in einem Wurzelhaar
 von *Trifolium subterraneum*
 (Aufnahme: Zeiß-Mikroskop, Objektiv
 90 $\times$, Phasenkontrast, Okular 5 $\times$)



che auf zweimal 209 und 288 Wurzelhaare). Obwohl alle mikroskopierten Präparate nur von solchen Stellen des Wurzelsystems stammten, an denen Knöllchenbildung prinzipiell möglich war, konnte keine auch nur einigermaßen regelmäßige Lokalisation der Infektionsschläuche festgestellt werden. Ihr gehäuftes Vorkommen an einzelnen Stellen der Wurzelsysteme kann nicht erklärt werden und verläuft auf keinen Fall mit den Zonen der verkrüppelten Wurzelhaare parallel, da die Wurzelhaare der meisten mikroskopierten Wurzelstücke größtenteils stark deformiert waren. Der Versuch bestätigt außerdem die bestehenden Theorien (s. p. 94 ff), wonach nicht jede Infektion zur Bildung eines Knöllchens führt. Wäre jede durch einen Infektionsschlauch hervorgerufene Infektion erfolgreich, so müßten an einem 1 cm langen Wurzelstück bis zu 16 Knöllchen entstehen, was aber nie beobachtet wurde.

Da ich auch bei allen andern Untersuchungen, z. B. bei Tausenden von Wurzelhaaren von *Pisum sativum* nie Infektionsschläuche feststellen konnte, außer dem einen, der in Tabelle 1 erwähnte wurde, und den am

speziellen Material von *Trifolium subterraneum* vorgefundenen, gilt in der folgenden Untersuchung ein Wurzelhaar dann als infiziert, wenn in ihm wenigstens ein mit Sicherheit als Bakterium identifizierbares Stäbchen zu erkennen ist.

Tabelle 4

Anzahl der durch einzeln auftretende Rhizobien und der durch einen Infektionsschlauch infizierten Wurzelhaare bei *Trifolium subterraneum*

Versuchsdauer: 27. September bis 18. Dezember. Geimpft wurden 19 Tage alte Pflanzen.

Die ersten Knöllchen waren am 6. Tag nach dem Impfen sichtbar

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der mikroskopierten Wurzelstücke (1 cm lang)	Anzahl der durch einzelne Bakterien infizierten Wurzelhaare			Anzahl der durch Infektionsschläuche infizierten Wurzelhaare		
			Anzahl	%	Anzahl der Infektionen in den einzelnen Wurzelstücken ¹	Anzahl	%	Anzahl der Infektionsschläuche in den einzelnen Wurzelstücken ¹
2	1 237	5	2	0,16	1, 1	0		
3	918	5	4	0,43	1, 1, 2	0		
4	598	6	3	0,50	1, 1, 1	0		
6	1 082	4	6	0,55	1, 5	0		
7	670	4	7	1,04	1, 1, 1, 4	0		
8	900	6	3	0,33	1, 1, 1	7	0,77	3, 4
9	471	4	2	0,46	1, 1	0		
10	1 090	6	0	0		34	3,11	1, 2, 4, 11, 16
13	1 014	6	6	0,59	1, 1, 4	8	0,78	3, 2, 3
15	1 415	12	5	0,35	1, 1, 1, 2	1	0,07	1
16	2 229	11	1	0,04	1	0		
17	1 334	6	2	0,14	2	17	1,27	1, 2, 14
	12 958	75	41	0,31		67	0,51	

Ob in den untersuchten Kombinationen von Bakterien und Leguminosen überhaupt keine Infektionsschläuche vorhanden waren, vermag ich nicht zu sagen; meine Aussage beschränkt sich darauf, daß sie selten vorkommen müssen, da ich trotz den Tausenden von untersuchten Wurzelhaaren keine gefunden habe. Es scheint also eine zweite Art der Infektion, nämlich eine durch lose, einzeln auftretende Bakterien zu geben. Dies sollte immer dann beachtet werden, wenn von der *Anzahl* der Infektionen gesprochen wird. Es ist unwahrscheinlich, daß die beobachteten Bakterien in den Wurzelhaaren die Vorstufe zur Bildung eines Infektionsschlauches im Wurzelhaar selbst sind, da ich andernfalls bei der relativ langen Untersuchungsdauer, bei der die Pflanzen doch in den

¹ Die Anzahl der Ziffern gibt die Zahl der infizierten Wurzelstücke an; die Größe der Ziffern gibt die Zahl der Infektionen pro Wurzelstück an.

verschiedensten Entwicklungsstadien beobachtet worden sind, eine der Infektionsrate entsprechende Anzahl von Infektionsschläuchen hätte finden müssen, und zwar selbst dann, wenn nur ein Teil der Infektionen zur Bildung der die Bakterien enthaltenden Zooglöa geführt hätte. Immer wieder und bei allen untersuchten Pflanzen fielen mir dagegen fadenähnliche Gebilde auf, die das Wurzelhaar der Länge nach durchzogen. Sie waren den Infektionsschläuchen *sehr ähnlich*, besonders bei der Betrachtung im Hellfeld, weniger im Phasenkontrastmikroskop: Beide scheinen bei Phasenbeleuchtung grau bis schwarz; beide weisen im Hellfeld eine granulierté Struktur auf. Die Granula in den Infektionsschläuchen sind allerdings nicht die Bakterien, was schon Fâhraeus (1957) vermutete. Nähere Untersuchungen zeigten, daß es sich bei diesen faden- oder schlauchähnlichen Gebilden um *geschrumpftes Plasma* handelt. Es war möglich, sie einige Male während der mikroskopischen Betrachtung künstlich durch Plasmolyse und anschließend schnelle und unvorsichtige Deplasmolyse hervorzurufen; das Plasma löste sich vollkommen von der Zellwand und schrumpfte, nachdem die Vakuole geplatzt war, zu einem dünnen Schlauch zusammen, der ebenfalls das Wurzelhaar der Länge nach durchzog.

Es könnte der Einwand erhoben werden, daß nur tote Wurzelhaare durch einzelne Bakterien infiziert werden, und nur bei toten die Bildung des Infektionsschlauches unterbleibt. Nun ist zuzugeben, daß im Zeitpunkt der mikroskopischen Betrachtung, die für sich allein den Lebenszustand nur schwer beurteilen läßt, die meisten Wurzelhaare wahrscheinlich tot waren, da sich nur zirka 1 bis 4 % plasmolysieren¹ ließen, während die meisten unverändert blieben und einige wenige schrumpften. Das unveränderte Aussehen könnte allenfalls so erklärt werden, daß das Protoplasma so stark an der Zellwand haftet, daß es sich nicht von ihr lösen kann. Da aber allein schon die Herstellung der Präparate genügte, die verschiedensten Formen von Reizplasmolyse hervorzurufen, darf diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Der Versuch, Farbstoffe zur Unterscheidung lebender und toter Wurzelhaare zu verwenden, scheiterte daran, daß auch solche Vitalfarbstoffe², die für die Zellen des Wurzelgewebes unschädlich waren, die Wurzelhaare oft schwer schädigten oder aber, daß lebende und tote Wurzelhaare sich auch gefärbt nicht unterschieden, wie Färbversuche von Wurzelhaaren von *Hydrocharis morsus ranae* zeigten, bei denen im ungefärbten Zustand die toten und lebendigen Wurzelhaare leicht zu erkennen sind. Auch wenn zum Plasmolysieren ausschließlich von den jüngsten Wurzelpartien, nämlich von den Wurzelspitzen stammende Wurzelhaare verwendet wurden, von denen ange-

¹ Als Plasmolytikum wurde 0,2 m, 0,5 m und 1 m Rohrzuckerlösung verwendet.

² Folgende Farbstoffe wurden zur Untersuchung verwendet: Acridinorange, Na-Fluoreszeïn, Rhodamin-B, Methylenblau und Neutralrot.

nommen werden darf, daß sie bis zur Präparation lebten, ließ sich der Prozentsatz der plasmolysierbaren Wurzelhaare nicht erhöhen, so daß der Schluß nahelegt, sie seien bei der Herstellung der Präparate abgestorben. Unsere Präparationsmethode erlaubt es also nicht, den Lebenszustand der Wurzelhaare im Zeitpunkt der Infektion zu beurteilen.

Tabelle 5

Anzahl der infizierten Wurzelhaare an den Wurzelspitzen von *Pisum sativum*

Versuchsdauer: 21. Juli bis 25. August. Die Pflanzen waren beim Impfen 23 Tage alt.
7 Tage nachher traten die ersten Knöllchen auf

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
2	361	5	1,38
5	244	2	0,81
6	563	2	0,35
7	463	3	0,64
8	388	5	1,28
9	585	1	0,17
	2604	18	0,69

Trotzdem darf mit Bestimmtheit angenommen werden, daß auch *lebende* Wurzelhaare durch einzelne Bakterien infiziert werden; denn wie der nächste, in Tabelle 5 wiedergegebene Versuch zeigt, waren auch in den jüngsten, noch wachsenden Wurzelhaaren von *Pisum sativum*, die bis zur Präparation zweifellos noch gelebt hatten, direkt hinter den Wurzelspitzen einzelne, lose Bakterien deutlich sichtbar, während Infektionsschläuche ausnahmslos fehlten. Damit ist der Einwand, daß nur tote Wurzelhaare durch einzelne, lose Bakterien infiziert würden, widerlegt. Er wäre übrigens unbeachtlich, weil das Wurzelhaar nicht notwendige Voraussetzung der Infektion ist.

In der Literatur (Peirce, 1902, Dangeard, 1926) wird beschrieben, daß Wurzelsysteme auch durch direkte Injektionen von Rhizobien zur Knöllchenbildung gebracht werden können und daß die Bakterien durch Verletzungen, wie sie z. B. durch das Hervorbrechen der Seitenwurzeln entstehen, in das Wurzelinnere eindringen und Zellteilung anregen können, daß also das Wurzelhaar umgangen werden kann. Im Normalfall scheinen die Bakterien durch die Wurzelhaare als dem «*locus minoris resistentiae*» einzudringen, der Weg der Infektion ist aber offensichtlich belanglos, so daß auch die Frage, ob die Wurzelhaare im Zeitpunkt der Infektion tot oder lebendig sind, irrelevant ist.

Wenn die Wurzelhaare, Ausstülpungen der Epidermiszellen, die bevorzugten Eintrittspforten der Bakterien sind, so muß sich der ausgestülpte Teil in irgendeiner Weise vom «Rest» der Epidermiszelle unterscheiden. Da die Epidermis der Wurzel keine Cuticula hat (Priestley, 1943; Esau, 1953), wie ich übrigens ebenfalls an Querschnitten durch Wurzeln von *Pisum sativum* festgestellt habe, muß der Unterschied in einer verschiedenartigen Struktur der Zellwand liegen. Daß Epidermiszellen und Wurzelhaare tatsächlich nicht die gleiche submikroskopische Struktur aufweisen, zeigten Frey-Wyssling und Mühlethaler (1949) in ihren elektronenoptischen Untersuchungen.

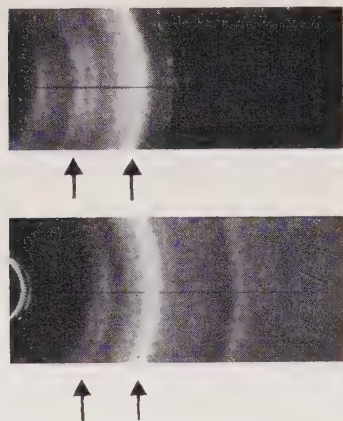
Den Infektionsvorgang selbst habe ich nie beobachten können, noch habe ich je an einer Wurzelhaarspitze Bakterienkolonien kleben gesehen, wie es schon beschrieben worden ist (Thornton, 1946; Gäumann, 1951).

Wenn die Wurzelhaare von Bakterien umgeben waren, was öfters der Fall war, so waren die Bakterien von der Spitze zur Basis gleichmäßig verteilt. Es bestanden deshalb keine *direkten* Anhaltspunkte für das Eindringen der Bakterien an der Wurzelhaarspitze, wie dies im allgemeinen angenommen wird (z.B. McCoy, 1932; Gäumann, 1951), obwohl der Infektionsvorgang selbst wohl noch von niemandem im Mikroskop verfolgt werden konnte. Die Wurzelhaarspitze, also die Wachstumszone des Wurzelhaars, ist nach Frey-Wyssling (1948) der schwächste Punkt der Zellwand, denn durch Anwendung von Säuren, Chloraten oder Salzen (Lundegårdh, 1946; Ekdahl, 1948) oder durch Anaerobiose (Kopp, 1948) kann ein Platzen der Wurzelhaarspitze provoziert werden. Diese Plasmoptysis der Wurzelhaare konnte tatsächlich bei unseren Untersuchungen oft beobachtet werden, obwohl sie nie absichtlich hervorgerufen wurde. Es besteht also die Möglichkeit, daß die Bakterien an der Spitze, als dem schwächsten Punkt des Wurzelhaares, eindringen, wenn es auch nicht erwiesen ist, daß sie die Zellwand nicht auch an andern Orten zu durchbrechen vermöchten.

Noch weniger geklärt ist, auf welche Art und Weise sie überhaupt eindringen. Unwahrscheinlich ist die enzymatische Auflösung der Zellwand durch die Rhizobien, wenigstens konnten bis heute weder Zellulose noch Pektin spaltende Fermente gefunden werden (Beijerinck, 1888; McCoy, 1932). Unsere Versuche, in denen die Wirkung einer Kulturlösung von *Rhizobium leguminosarum* auf Carboxymethylzellulose mit der sehr empfindlichen Viscosimetermethode geprüft wurde, verliefen ebenfalls negativ (Methode bei Schäfer, 1957)¹. Ebenso wenig gelang es, Watte oder Filtrierpapier durch Rhizobien abbauen zu lassen. Und doch enthalten die Wurzelhaare von *Pisum sativum* wenigstens so viel kristal-

¹ Die Messungen wurden von Dr. A. Schäfer hier durchgeführt, dem ich herzlich dafür danke.

line Zellulose (vgl. Fig. 4), daß sie in einem Debey-Scherrer-Röntgendiagramm nachgewiesen werden konnte¹ (Methode bei Frey, 1950). Da nach Frey-Wyssling und Mühlethaler (1949, 1950) die Wurzelhaarwand zur Hauptsache aus Pektinen und aus einem *sehr lockeren* Gewebe von Zellulosemikrofibrillen besteht, wäre es durchaus denkbar, daß die Bakterien rein mechanisch, ohne die Zellwand durch Enzyme partiell aufzulösen, in die Wurzelhaare eindringen. Sind sie einmal dort, so können sie durch Tüpfel in die nächst tieferen Zellschichten gelangen, wo



Figur 4
Röntgendiagramme
oben: Zellulose aus Wurzelhaaren von *Pisum sativum*
unten: Zellulose aus Baumwollfasern
Die Pfeile geben die entsprechenden Interferenzen für Zellulose an

sie sich sodann zu der schleimigen, fädigen Zooglöa zusammenschließen könnten. Diese Annahme ist nicht unwahrscheinlicher als diejenige eines plötzlich in einem Wurzelhaar entstehenden Infektionsschlauchs.

2. Infektionsrate in Abhängigkeit von der Versuchsdauer

Zwischen dem Impfen und den ersten sichtbar werdenden Knöllchen verstreichen ausnahmslos *einige* Tage, und zwar selbst dann, wenn junge, immerhin schon einige grüne Blätter aufweisende, kräftige Pflanzen geimpft werden. Bei meinen Versuchen fand ich die ersten Knöllchen bei Erbsen frühestens nach sechs Tagen und bei Lupinen, Bohnen, Klee und Luzernen noch später. Es stellt sich die Frage, ob die Infektion erst dann stattfindet, wenn die Symbionten während einer gewissen Zeit aufeinander eingewirkt haben, oder aber, ob die Bakterien nach relativ kurzer Zeit in die Wurzelhaare eindringen, die Zellteilung, d. h. die Knöllchenbildung jedoch erst später anregen. Von Interesse war ferner, ob die Anzahl der infizierten Wurzelhaare in der Zeit zwischen Impfung und reichlicher Knöllchenbildung zunimmt, abnimmt oder gleich bleibt.

¹ Die unter Binokularkontrolle von den Epidermiszellen abgelösten Wurzelhaare ergaben das Ausgangsmaterial für die Analyse, die freundlicherweise von Dr. R. Frey hier durchgeführt wurde.

Bei verschiedenen Untersuchungen an Erbsen, Klee und Luzernen konnten schon in den *ersten 20 Stunden* nach dem Impfen Bakterien in den Wurzelhaaren junger sowie alter Wurzelteile festgestellt werden. Dagegen konnte keine regelmäßige Zu- oder Abnahme der Anzahl der infizierten Wurzelhaare während einer längeren Untersuchungsperiode beobachtet werden. Tabelle 6 veranschaulicht das Ergebnis am Beispiel von zwei Versuchen, die mit *Pisum sativum* durchgeführt worden waren.

Tabelle 6

Die Infektionsrate in Abhängigkeit von der Versuchsdauer bei *Pisum sativum*

A. Versuchsdauer: 3. Februar bis 26. März. Die Pflanzen waren beim Impfen 22 Tage alt. 7 Tage nachher traten die ersten Knöllchen auf. Beim Abbruch des Versuchs war die durchschnittliche Zahl der Knöllchen pro Kontrollpflanze 131,5

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
2	600	1	0,16
3	500	8	1,60
4	800	2	0,25
5	800	3	0,37
6	800	7	0,87
7	800	4	0,50
9	800	3	0,37
10	800	6	0,75
11	800	2	0,25
12	800	1	0,12
13	800	0	0
28	600	0	0
	8900	37	0,41

B. Versuchsdauer: 31. Oktober bis 21. Dezember. Die Pflanzen waren beim Impfen 28 Tage alt. 7 Tage nachher traten die ersten Knöllchen auf. Beim Abbruch des Versuchs war die durchschnittliche Zahl der Knöllchen pro Kontrollpflanze 76,7

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
1	200	5	2,5
2	400	0	0
3	200	1	0,5
4	300	0	0
7	100	1	1
10	100	1	1
25	200	2	1
	1500	10	0,66

Der in Tabelle 7 angeführte Versuch soll, da er auf relativ großem Zahlenmaterial basiert, mit denjenigen Versuchen verglichen werden, welche die Infektionsrate von unter andern Bedingungen gehaltenen Leguminosen und von Nichtleguminosen zeigen. Berechnungen von X^2 nach Fisher (1954, § 21, Contingency Tables, Ex. 11) auf Grund der in Tabelle 6 angeführten Zahlen der pro Tag gefundenen Infektionen ergaben, daß die Streuung im *Ganzen* größer war als für eine homogene Gesamtheit zu erwarten gewesen wäre. Der große Wert von X^2 ist aber nur auf den dritten Untersuchungstag zurückzuführen, an dem von 500 untersuchten acht infizierte Wurzelhaare gefunden wurden. Die Zahlen der an den restlichen Tagen festgestellten infizierten Wurzelhaare liegen im Rahmen zufälliger Schwankungen. Für die später folgenden Vergleiche wurden deshalb die Zahlen dieses dritten Untersuchungstages weggelassen. Anhand dieses Zahlenmaterials können wir daher keine regelmäßige Zu- oder Abnahme der Anzahl infizierter Wurzelhaare in der Zeit zwischen Impfen und reichlicher Knöllchenbildung feststellen.

3. Relation zwischen der Anzahl der Infektionen und der Anzahl der Knöllchen

Beim Verhältnis zwischen der Anzahl der Infektionen und der durch sie bewirkten Knöllchen sind drei Möglichkeiten denkbar, nämlich, daß jedes infizierte Wurzelhaar zu einem Knöllchen führt (gleichviel Infektionen wie Knöllchen), daß im Extremfall jede Infektion mehrere Knöllchen verursacht, wobei wir uns vorstellen müßten, daß die Bakterien im Wurzelsystem wandern und an verschiedenen Orten Zellteilungen hervorrufen (weniger Infektionen als Knöllchen) oder aber, daß nur aus einem Teil der infizierten Wurzelhaare Knöllchen entstehen (mehr Infektionen als Knöllchen). Die dritte Möglichkeit schließt zwar die zweite nicht vollkommen aus, da man sich vorstellen könnte, daß zwar nicht alle Infektionen Knöllchenbildung bewirken, trotzdem aber einzelne Infektionen zu mehreren Knöllchen führen.

Nach Wipf und Cooper (1940) entstehen nur dort Knöllchen, wo ein Infektionsschlauch auf eine tetraploide Rindenzelle stößt. Nach Nutman (1948) sind Knöllchen umgewandelte Seitenwurzeln und entstehen an zu Seitenwurzelanlagen prädestinierten Stellen. Ob sich die beiden Theorien vereinen lassen, d.h. ob auch Seitenwurzelanlagen mit dem Vorkommen tetraploider Zellen zusammenhängen, müßte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Immerhin darf wohl die dritte Variante, daß ein Wurzelsystem mehr infizierte Wurzelhaare als Knöllchen aufweist, als die wahrscheinlichste bezeichnet werden, wobei, wie gesagt, eine einzelne Infektion auch mehrere Knöllchen verursachen kann. Wir prüften, ob die Untersuchung das auf Grund von Überlegungen gefundene Verhältnis bestätigt, wobei wir uns zum Teil jedoch mit Schätzungen begnügen mußten. Dabei gingen wir folgendermaßen vor: Von drei will-

kürlich ausgewählten Knöllchen tragenden Erbsen wurden an je 16, wiederum willkürlich ausgewählten, 1 cm langen Wurzelstücken die Wurzelhaare im Binokular gezählt und mit der gemessenen Gesamtlänge der Wurzeln multipliziert. Allerdings entziehen sich die zur Unterlage senkrecht stehenden Wurzelhaare der Sicht, so daß man für sie auf Schätzungen angewiesen ist. Nimmt man nun an, daß der gezählte Anteil zwei Drittel der rings um das 1 cm lange Wurzelstück wachsenden Haare beträgt, so erhält man eine Gesamtzahl, die mit dem Anspruch großer Wahrscheinlichkeit unserer Untersuchung zugrundegelegt werden darf. Das Resultat findet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7

Relation zwischen der Zahl der Infektionen und der Anzahl der Knöllchen am Beispiel von drei Pflanzen von *Pisum sativum*.

Versuchsdauer 25. August bis 20. Oktober. Die 3 Pflanzen waren beim Impfen 20 Tage alt

Länge des Wurzel-systems m	Anzahl der Wurzelhaare		Anzahl der Knöllchen	«Erfolgreich» infizierte Wurzelhaare ¹	
	pro 1 cm Wurzel-länge	pro Gesamt-Wurzel-system		in % der Gesamtzahl der Wurzelhaare	in % der für Knöllchenbildung zur Verfügung stehenden Anzahl der Wurzelhaare = die Hälfte der Gesamtzahl
1. 4,50	316	142 484	92	0,06	0,12
2. 5,30	180	95 526	114	0,11	0,22
3. 4,18	83	34 685	49	0,14	0,28

Bei der ersten der von uns genannten Möglichkeiten deckt sich die Anzahl der infizierten Wurzelhaare mit derjenigen der Knöllchen. Bei der Durchrechnung der in Tabelle 7 gegebenen Zahlen ergibt sich, daß etwa 0,1 % (0,06 %, 0,11 %, 0,14 %) aller Wurzelhaare infiziert sein müßte, wenn die Anzahl der infizierten Wurzelhaare der Anzahl der Knöllchen entspricht. Die Beobachtung im Mikroskop ergab jedoch bei verschiedenen Untersuchungen eine ungefähre Infektionsrate von 0,4 %. Es wurden also mehr infizierte Wurzelhaare gezählt, als die Anzahl der gefundenen Knöllchen erfordert hätte. Bei Annahme der zweiten Variante wäre der Überschuß an infizierten Wurzelhaaren noch größer. Daraus ergibt sich, daß für Erbsen die dritte Variante anzunehmen ist, d.h. daß nur ein Teil der infizierten Wurzelhaare zu Knöllchenbildung führt, also «erfolgreich» ist. Wird ferner berücksichtigt, daß ein Drittel bis die Hälfte der Wurzelhaare der untersuchten Wurzelsysteme für die Infektion, oder besser für die daraus resultierende Knöllchenbildung, außer Betracht fällt, da, wie im nächsten Kapitel noch gezeigt wird, Knöllchen nur an den nach dem Impfen gewachsenen Wurzelteilen entstehen (die untersuchten Pflanzen wurden 20 Tage nach dem Quellen geimpft), so redu-

¹ Unter der Voraussetzung, daß jedem Knöllchen ein infiziertes Wurzelhaar entspricht.

ziert sich die Anzahl der «erfolgreich» infizierbaren Wurzelhaare auf zirka 50 %. Die theoretisch gefundene Rate infizierter Wurzelhaare müßte dementsprechend von 0,1 % auf ungefähr 0,2 % (0,12 %, 0,22 %, 0,28 %) erhöht werden, während, wie erwähnt, die mikroskopische Beobachtung zirka 0,4 % ergeben hatte (vgl. Tabelle 6). Dies zeigt, daß bei Erbsen nur jede zweite bis dritte Infektion Knöllchenbildung bewirkt. Die Infektion resultiert also nur an gewissen, *von der höheren Pflanze determinierten Stellen in Knöllchenbildung.*

4. Lokalisation der Knöllchen

Es ist bekannt, daß Knöllchen nur an jungen Wurzelteilen entstehen (Schaeede, 1948), ohne daß aber mit Exaktheit angegeben werden konnte, wie jung die Wurzeln sein müssen, um auf den Reiz der Bakterien mit Zellteilungen reagieren zu können. Unsere Untersuchungen an Erbsen, durch welche die Lokalisation der Knöllchen geklärt werden sollte, zeigten, daß *Knöllchen ausschließlich an Wurzelpartien entstanden, die nach dem Impfen der Kulturlösung gewachsen* oder im Zeitpunkt des Impfens noch meristematisch waren oder an solchen Stellen älterer Wurzeln, an denen nach dem Impfen eine Seitenwurzel entsprang; dagegen waren junge, aber schon ausdifferenzierte Wurzelpartien nicht mehr zur Knöllchenbildung fähig.

Zu dieser Beobachtung führte eine Methode, die es erlaubte, die *nach* einem bestimmten Zeitpunkt, in diesem Fall nach der Impfung, gewachsenen Wurzelpartien deutlich von den *vorher* gewachsenen zu unterscheiden. Die Versuchspflanzen, Erbsen, wurden, wie beschrieben, in Keimröhrchen und in Kolben aufgezogen, nur daß das Wasser in den Keimröhrchen und die Nährlösung in den Kolben mit Na-Fluoreszein¹ (1:10 000, pH zwischen 6,2 und 6,5) gefärbt waren, wodurch das Wachsen der Wurzeln in keiner Weise gestört wurde. Achtzehn Tage nach dem Quellen wurde die gefärbte Nährlösung durch eine farblose ersetzt, nachdem die Farbreste von den Wurzeln aseptisch weggespült worden waren, und dann die neue Nährlösung geimpft. Die vor dem Impfen gewachsenen Wurzeln hatten sich angefärbt und fluoreszierten im UV-Licht leuchtend gelb, während die nachher gewachsenen farblos blieben. Der

¹ Außer Na-Fluoreszein wurden Neutralrot, Methylenblau, Auramin, Pyronin, Acridinorange und Rhodamin-B auf ihre Eignung geprüft. Methylenblau und Auramin erwiesen sich als ungeeignet, da die Wurzeln in keiner der angewendeten Farbstoffkonzentrationen zu wachsen vermochten. Acridinorange hatte in denjenigen Konzentrationen, die eine deutliche Färbung verursachten, ebenfalls Wachstumsstörungen zur Folge, während die Wurzeln in Pyronin zwar gut wuchsen, aber keine Knöllchen bildeten. Schwache Konzentrationen von Neutralrot und Rhodamin-B (1:100 000 und schwächer) erlaubten gutes Wurzel- und Knöllchenwachstum, waren aber für unsere Zwecke nicht geeignet, weil die gefärbten Wurzeln den Farbstoff in die farblose Nährlösung abgaben, was eine scharfe Grenze zwischen den gefärbten und den ungefärbten Wurzelpartien verunmöglichte.



Figur 5

Wurzeln von Pisum im Ultraviolett-Licht

Die Wurzeln wuchsen 18 Tage in natriumfluoreszeinhaltiger Nährlösung, die vor dem Impfen durch farblose ersetzt wurde. Die im Bild weißen Wurzelpartien sind angefärbt; sie fluoreszieren im ultravioletten Licht leuchtend gelb, während die ungefärbten, jüngeren Wurzelteile mit Knöllchen schwächer sichtbar sind.

Kontrast, schon im gewöhnlichen Licht erkennbar, ist im UV-Licht äußerst stark, und die Grenze zwischen gefärbt und ungefärbt, ohne lang-samen Übergang, ganz scharf (Fig. 5). Die Knöllchen entstanden entweder *genau an der Grenze oder an den ungefärbten Wurzelpartien*, d. h. an Orten, die beim Impfen entweder noch meristematisch oder noch gar nicht gebildet waren. Daß die Infektion nicht über die Lokalisation der Knöllchen entscheidet, geht daraus hervor, daß sowohl alte wie junge Wurzelpartien infiziert werden können.

Die Weiterverfolgung solcher Untersuchungen könnte uns möglicher-weise zu einer neuen Auffassung über die Entstehungsweise der Knöllchen führen.

Da bei Kontrollpflanzen, die in der gleichen Art und Weise aufgezogen, jedoch neun Tage nach dem Quellen, also neun Tage vor dem Ersetzen der gefärbten durch die farblose Nährlösung, geimpft worden waren, auch an den gefärbten Wurzelpartien Knöllchen entstanden, kann der Einwand, die Färbung habe die Knöllchenbildung verhindert, widerlegt werden.

Diese Methode der Kennzeichnung bestimmter Wurzelpartien durch Färbung ist darüber hinaus überall dort anwendbar, wo festgestellt werden soll, welche Wurzelpartien von einem bestimmten Zeitpunkt an gewachsen sind.

5. Bedeutung des Sprosses für die Infektion

Man weiß, daß ganz junge Pflanzen oder Wurzelsysteme ohne Sproß oder mit etioliertem Sproß keine Knöllchen bilden, d. h. daß der grüne Sproß für die Knöllchenbildung unentbehrlich ist (Thornton, 1929b, 1930b; Nutman, 1956; Rudin, 1956). Zwar werden in der Literatur einige seltene Fälle erwähnt, bei denen in einer kohlehydrathaltigen Nährlösung an abgeschnittenen Wurzeln und an etiolierten Pflanzen ausnahmsweise Knöllchen beobachtet worden waren (Lewis und McCoy, 1933, Wilson, 1931); meine eigenen Versuche in dieser Richtung verliefen jedoch negativ (s. a. Rudin, 1956, p. 61).

Es wurde daraufhin untersucht, ob bei Pflanzen *ohne* grünen Sproß wenigstens die Voraussetzung der Knöllchenbildung, die *Infektion*, eintritt.

In verschiedenen Versuchen wurden *etiolierte Erbsen*, die nur in der kurzen Zeit, während der sie auf die Keimröhrchen und die Kolben gesetzt wurden, dem Licht ausgesetzt worden waren, auf Infektionen untersucht. In Tabelle 8 wird aus einer Reihe gleicher Untersuchungen, bei denen die Erbsen in stickstoff- und kohlenstoffreier Nährlösung aufgezogen worden waren, das mehrmals beobachtete Ergebnis, nämlich das Vorkommen von Rhizobien in den Wurzelhaaren, dargestellt. Die Anzahl der infizierten zur Anzahl der untersuchten Wurzelhaare betrug 0,44%.

Die Infektionsrate entspricht also ungefähr derjenigen grüner, Knöllchen-bildender Erbsen (vgl. Tabelle 6). Während es, wie erwähnt, an den etiolierten Erbsen nie zur Knöllchenbildung kam, wiesen die dem Tageslicht ausgesetzten Kontrollpflanzen durchschnittlich 91 Knöllchen pro Pflanze auf. Das Fehlen des Lichtes verhindert also *nicht die Infektion, sondern die Knöllchenbildung*.

Tabelle 8

Anzahl der infizierten Wurzelhaare bei etiolierten Pflanzen (*Pisum sativum*)

Versuchsdauer: 1. März bis 29. April. Die Pflanzen waren beim Impfen 21 Tage alt. Es bildeten sich keine Knöllchen. 5 dem normalen Tageslicht ausgesetzte Kontrollpflanzen hatten durchschnittlich 91 Knöllchen pro Pflanze

Zwischen Impfen und Unter- suchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
3	800	4	0,50
4	800	1	0,12
5	700	1	0,14
11	700	12	1,71
12	600	3	0,50
13	800	2	0,25
14	800	0	0
17	600	3	0,50
	5800	26	0,44

Es waren aber auch keinerlei Anzeichen für eine erhöhte Anfälligkeit etiolierter Pflanzen für Rhizobien zu entdecken, die nach Gäumann (1951) deshalb auftreten soll, weil die Abwehrreaktionen, der in Bezug auf Kohlehydrate und Stickstoffverbindungen unterernährten Pflanzen zu schwach seien, um die das Wurzelgewebe überschwemmenden und in die Interzellularräume tretenden Bakterien abwehren zu können, wodurch rascher Zerfall des Wurzelgewebes eintrete, ohne daß Knöllchen gebildet würden¹. Auch nach monatelanger Kultur zeigten die Wurzeln der im Dunkeln gehaltenen Erbsen und Luzernen bei allen durchgeführten Versuchen keinerlei Anlage zum Zerfall.

Daß die Knöllchenbildung mit der C'-Assimilation zusammenhängt, wurde schon verschiedentlich festgestellt. Anzahl und Größe der Knöllchen wird nicht nur durch längere und stärkere Belichtung (Diener, 1950; Rudin, 1956), sondern auch erhöhten C'O₂-Druck gefördert

¹ Die von Kern (1956) wiederholte Beschreibung scheint auf einer ungenau wiedergegebenen Beobachtung Thorntons (1930) zu beruhen, der von Zerfall der *Knöllchen*, nicht aber der Wurzeln spricht, wenn die Pflanzen nach bereits erfolgter Knöllchenbildung ins Dunkle gebracht werden.

(Wilson, Fred, Salmon, 1933). Obwohl die Pflanzen Zucker aus der Nährlösung aufnehmen können und ihn in gleicher Weise wie den in den Blättern gebildeten verwenden (Allison, 1935), blieben alle unsere Versuche, etiolierte Erbsen durch Zuckerzugabe zu Knöllchenbildung zu veranlassen, erfolglos. Die Annahme, einzige Ursache des Ausbleibens der Knöllchen bei etiolierten Pflanzen sei das Fehlen der in den grünen Blättern gebildeten Kohlehydrate, ist daher falsch. Was schließlich bei belichteten Pflanzen die Knöllchenbildung ermöglicht, ist unbekannt.

Nachdem sich ergeben hatte, daß die Infektion der Erbsen nicht an den *grünen* Sproß gebunden ist, stellte sich die weitere Frage, ob sich junge Pflanzen in einem Stadium, in dem sie noch keine Knöllchen bilden, infizieren lassen, d. h. ob das Alter für die Infektion eine Rolle spielt. Es wurden deshalb junge, vier bis elf Tage alte Erbsen, deren Epicotyl zirka 1 bis 5 cm lang war, und deren Blättchen sich noch nicht entfaltet hatten, auf Infektionen untersucht. Die Erbsen waren einen Tag nach dem Quellen geimpft worden. Sie hatten im Zeitpunkt der Untersuchung bereits Seitenwurzeln, aber nur wenige Wurzelhaare, so daß bei einigen Erbsen alle mit Haaren besetzten Wurzelstücke mikroskopiert werden konnten. In den insgesamt 4108 untersuchten, teilweise verkrüppelten Wurzelhaaren konnten weder Bakterien noch Infektionsschläuche gefunden werden (s. Tab. 9). Der Unterschied zu älteren, grünen, normal Knöllchen bildenden Erbsen (vgl. Tab. 6) ist signifikant ($P = 0,001$). In die Wurzelhaare junger Erbsen, deren Blättchen noch nicht entfaltet waren, drangen die Bakterien also nicht ein, oder höchstens so selten, daß trotz der großen Anzahl mikroskopierter Wurzelhaare keine Infektionen festgestellt werden konnten.

Tabelle 9

Anzahl der infizierten Wurzelhaare bei 4 bis 11 Tage alten Pflanzen (*Pisum sativum*)
Versuchsdauer: 28. August bis 12. September. Die Pflanzen wurden 1 Tag nach dem Quellen geimpft. Das Epicotyl der Pflänzchen war bei der Untersuchung zirka 1–5 cm lang, die Blättchen noch nicht entfaltet

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare
2	525	0
3	599	0
4	1026	0
5	709	0
6	621	0
7	628	0
	4108	0

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der weiteren Frage, ob der Sproß, sei er nun grün oder etioliert, für die Infektion notwendig sei. Deshalb wurden die 2 bis 3 cm langen Epicotyle von Pflanzen, die gleichzeitig mit denjenigen des vorigen Versuchs gezüchtet worden waren, am 5. Tag nach dem Quellen abgeschnitten und die Wurzelsysteme der 13 bis 20 Tage alten Pflanzen auf Infektionen untersucht (s. Tab. 10). Das Wurzelsystem wuchs auch ohne Sproß weiter; die sich neu bildenden Sprosse wurden immer wieder abgeschnitten. Auf Tabelle 10 ist dargestellt, daß sich bereits am ersten Untersuchungstag, also an 13 Tage alten Pflanzen, Bakterien in den Wurzelhaaren fanden. Die durchschnittliche Infektionsrate betrug 0,51 %, ergibt also keinen signifikanten Unterschied zu derjenigen in Tabelle 6 von normal Knöllchen bildenden Erbsen mit grünem Sproß.

Tabelle 10

Anzahl der infizierten Wurzelhaare an Wurzelsystemen von *Pisum sativum* ohne Sproß. Versuchsdauer: 28. August bis 15. Oktober. Den Pflanzen wurde am 5. Tag nach dem Quellen das 2 bis 3 cm lange Epicotyl abgeschnitten und am 11. Tag die Bakteriensuspension beigegeben. Die Wurzelsysteme bildeten während der ganzen Versuchsdauer keine Knöllchen

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
2	643	2	0,31
3	517	2	0,38
4	603	6	0,99
5	600	2	0,33
6	505	3	0,59
7	606	5	0,82
9	607	1	0,16
	4081	21	0,51

Zusammenfassend darf gesagt werden, daß junge Erbsen, deren Blättchen noch nicht entfaltet sind, nicht infiziert werden und infolgedessen auch keine Knöllchen bilden, während gleichzeitig aufgezoogene, älter gewordene Wurzelsysteme trotz Abschneidens des Sprosses Infektionen zeigen, wenn auch die Knöllchenbildung, unabhängig vom Kohlehydratgehalt der Nährlösung, durch die Amputation verhindert wird. *Der grüne Sproß ist also für die Knöllchenbildung, nicht aber für die Infektion notwendig.*

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit den von Thornton (1929b) für Luzerne gefundenen: Er beobachtete, daß junge Luzernepflanzen vor dem Öffnen des ersten Blattes weder infiziert werden, noch Knöllchen bilden. Verschiedene Experimente, unter anderem das Kultivieren junger und älterer Pflänzchen im gleichen Gefäß, was zu verfrühter Infektion

und Knöllchenbildung bei den jungen führte, veranlaßten ihn zur Annahme, daß Luzernepflanzen einen Stoff sezernieren, der von einer bestimmten Konzentration an die Infektion erst ermöglicht, was mit dem Öffnen des ersten Blattes zeitlich zusammenfällt. Das Abschneiden der ersten noch nicht geöffneten Blättchen verzögerte die Knöllchenbildung nicht, während sie durch das Entfernen der Kotyledonen so lange hinausgeschoben wurde, bis der Sproß und die Blätter eine gewisse Größe erreicht hatten. Er schloß daraus, daß die aktiven, die Infektion und das frühe Erscheinen von Knöllchen kontrollierenden Substanzen von den Kotyledonen in die Wurzel wanderten, um dort in die Nährlösung ausgeschieden zu werden. Ob die von Thornton für die Infektion von Luzernen gegebene Deutung auch für Erbsen zutrifft, müßten weitere Versuche zeigen. Dafür spricht, daß junge Pflänzchen nicht, ältere aber, obwohl sie keinen Sproß, sondern nur Kotyledonen hatten, infiziert wurden. Andere Autoren bestätigten die Theorien der aktiven, die Knöllchenbildung fördernden Wurzelausscheidungen auch für andere Leguminosenarten, wobei ihr Untersuchungskriterium allerdings nicht die Infektion, sondern die Knöllchenbildung war (Ludwig und Allison, 1935; Nutman, 1956).

6. Einfluß von Nitrationen auf die Infektion

Es ist bekannt, daß Stickstoffverbindungen, vor allem Nitrate, die Knöllchenbildung an Leguminosen und die Fähigkeit, Stickstoff zu assimilieren, stark herabsetzen, ja sogar bei starken Konzentrationen vollständig unterdrücken (Thornton und Nicol, 1936, Virtanen, 1947). Hierfür gibt es viele Erklärungsversuche¹, bei denen allerdings Infektion und Knöllchenbildung häufig derart identifiziert wird, daß ohne weitere Prüfung angenommen wird, nicht nur die Knöllchenbildung, sondern bereits die Infektion werde verhindert (Kern, 1956; Rippel-Baldes, 1952, Diener, 1950). Außerdem basiert die Annahme, wenn überhaupt Untersuchungen durchgeführt worden waren, auf so wenigem Material, daß bei der an und für sich sehr niedrigen Infektionsrate (vgl. Tab. 6) aus den wenigen, negativen Beobachtungen nicht auf das Fehlen von Infektionen geschlossen werden dürfte (Diener, 1950; Thornton, 1936). Jeder Deutungsversuch für das Ausbleiben der Knöllchenbildung kann aber nur dann fruchtbar sein, wenn, wie schon in der Einleitung postuliert, darüber Klarheit herrscht, wonach gesucht werden soll: nach dem Grund für das Ausbleiben der Infektion oder nach demjenigen für das Ausbleiben der Knöllchenbildung an der infizierten Pflanze.

In den folgenden Versuchen soll deshalb untersucht werden, ob Rhizobien die Wurzelhaare von Erbsen, die in einer die Knöllchenbildung

¹ Eine Übersicht über die dieses Gebiet behandelnden Arbeiten mit entsprechenden Literaturangaben geben Nutman 1956 und Diener 1950.

vollkommen unterbindenden Nitrationskonzentration aufwuchsen, infizieren. In Vorversuchen mußte, da die Angaben hierüber sehr schwanken (Thornton und Nicol, 1936), zunächst festgestellt werden, bei welcher Konzentration die Knöllchenbildung ausbleibt. Bei einer Nährlösung¹, die gesamthaft 1,81 g Nitrationen pro Liter enthielt (= die doppelte Menge der in der Knopschen Nährlösung angegebenen Nitrate), entstanden nie Knöllchen. Diese Nährlösung wurde in den folgenden Versuchen verwendet.

Mehrere zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführte Versuche mit Erbsen ergaben eindeutig, daß Rhizobien auch bei dieser hohen Nitrationskonzentration in die Wurzelhaare von Erbsen eindringen. Die Bakterien hatten, wie in allen vorher besprochenen Versuchen, die Fähigkeit, sich im Wurzelhaar aktiv zu bewegen; auch scheint die mehrfache Beobachtung von Wurzelhaaren, die mit Bakterien prall gefüllt waren, darauf hinzudeuten, daß sie sich dort vermehrt hatten. Tabelle 11 zeigt die Anzahl der infizierten Wurzelhaare, die bei einem der verschiedenen Versuche gefunden worden war. Der Unterschied der Infektionsrate zwischen Erbsen, die unter Zugabe von Nitrationen und solchen, die in gewöhnlicher Nährlösung aufwuchsen, und daher die übliche Knöllchenzahl aufwiesen, ist nicht signifikant, so daß wir den scheinbar kleineren Prozentsatz der infizierten Wurzelhaare in N-haltiger Nährlösung nicht auf die Nitrationen zurückführen dürfen. Die Infektion, die Voraussetzung

Tabelle 11

Anzahl der infizierten Wurzelhaare von Erbsen, gewachsen in einer Nährlösung, deren Nitrationskonzentration die Knöllchenbildung vollkommen unterdrückt

Versuchsdauer: 3. September bis 5. November. Die Pflanzen waren beim Impfen 20 Tage alt. Während der ganzen Versuchsdauer bildeten sich keine Knöllchen

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
2	800	2	0,25
3	800	1	0,12
4	810	0	0
5	806	0	0
6	600	0	0
13	410	0	0
16	714	1	0,14
19	454	5	1,10
	5394	9	0,16

¹ Rezept: 2 g Ca (NO₃)₂; 0,25 g MgSO₄·7H₂O; 0,068 g KH₂PO₄; 0,261 g K₂HPO₄; 0,5 g KNO₃ pro Liter. Die Nährlösung wurde gleich hergestellt wie diejenige, die keinen Stickstoff enthielt.

der Knöllchenbildung, ist also auch in einer Nährlösung eingetreten, deren NO_3^- -Konzentration die Knöllchenentwicklung vollkommen unterbindet.

Gäumann (1951) begründet die fehlende Knöllchenbildung bei reichlicher Stickstoffernährung sowie bei mangelnden Assimilaten mit einer durch die Ernährung bedingten Stärkung resp. Schwächung der Wirtspflanzen. Nach ihm ist der Wirt bei harmonischer Ernährung (genügend Licht und Stickstoff) dem Parasiten gewachsen, d.h. für den Befall durch Knöllchenbakterien nicht disponiert, während er im andern Extrem bei Stickstoff- und Kohlehydratmangel dem Parasiten unterlegen ist und die Bakterien nicht lokalisieren kann. Nur bei partieller Unterernährung (Mangel an Stickstoff, nicht aber an Kohlehydraten), sind sich Parasit und Wirt ebenbürtig, woraus eine reichliche Knöllchenbildung und eventuelle Stickstoffbindung resultiert.

In ihrer extremen Form wird diese Hypothese durch die geschilderten Versuchsergebnisse widerlegt, denn die Bakterien können, wie gezeigt, auch die Wurzelhaare vollwertig ernährter Pflanzen infizieren und sich, so scheint es wenigstens, in den Wurzelhaaren und den sie bildenden Epidermiszellen vermehren. Bei Kohlehydrat- und Stickstoffmangel wurde, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, weder eine erhöhte Infektionsbereitschaft noch ein Zerfall der Wurzeln beobachtet.

Ob eine weniger extreme Form dieser Hypothese gültig wäre, daß nämlich die Bakterien die Pflanze bei harmonischer Ernährung wohl infizieren, sich aber dank der Abwehrreaktionen des Wirtes in den Rindenzellen nicht ausbreiten und stark vermehren könnten, müßte durch umfangreiche histologische Studien sichergestellt werden. In gleicher Weise müßte der Nachweis dafür erst erbracht werden, daß die Unterernährung des Wirtes die Lokalisierung der Bakterien verhindere.

Die Vorstellung einer generellen Stärkung der Pflanzen durch Nitrate und einer dadurch erhöhten Abwehrbereitschaft ist schon von Thornton und Nicol (1936) auf Grund eines Experimentes von I. K. Wilson (1917) abgelehnt worden. Wilson teilte das Wurzelsystem von Sojabohnen in zwei Hälften, deren eine er in einem nitrathaltigen, die andere in einem nitratfreien Milieu wachsen ließ. Die in stickstofffreiem Milieu gewachsene Wurzelhälfte entwickelte eine normale Anzahl von Knöllchen, während die andre Hälfte keine oder höchstens ganz wenige aufwies, was darauf hindeutet, daß die Wirkung der Nitrate *lokal* ist. Das Experiment wurde später von Gäumann, Jaag und Roth (1945) und von Diener (1950) mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

Von verschiedenen Forschern (s. Literatur bei Nutman, 1956, Diener, 1950) wird dem Kohlestoff-Stickstoff-Verhältnis in den Pflanzen bei der Regulierung der Knöllchenbildung eine entscheidende Bedeutung beigemessen. Aber auch diese Erklärungsversuche sind vorläufig nicht überzeugend. Denn schon Virtanen (1947) stellte fest, daß Nitrate die

Knöllchenbildung in viel geringerer Konzentration unterdrücken als Ammoniumverbindungen, obwohl Erbsen Ammoniumionen viel rascher als Nitrate aus der Nährlösung aufnehmen. Er schreibt deshalb den Nitraten eine spezifische, die Knöllchenbildung hindernde Wirkung zu.

Thornton und Nicol (1936) beobachteten, daß Nitrate weniger die *Anzahl* als das *Volumen* der Knöllchen reduzierten. Da wir nun eindeutig eine Infektion der in hohen Nitratkonzentrationen wachsenden Pflanzen festgestellt haben, scheint Thorntons Beobachtung eher darauf hinzudeuten, daß die Bakterien bei hohen, die Knöllchenbildung vollkommen unterbindenden Konzentrationen an Nitraten die Wirtszellen nicht zu Teilungen anregen, als daß sie durch das Wirtsgewebe unterdrückt werden.

7. Untersuchungen über die Infektion von Pisum sativum durch Rhizobium trifolii

Die Rhizobien zerfallen in eine Anzahl von Rassen, deren jede an bestimmten Leguminosen Knöllchen erzeugt. Warum die Bakterien der einzelnen Rassen sich bei den verschiedenen Wirtspflanzen nicht vertreten können, ist ein ungelöstes Problem. Auch bei der Behandlung dieser Frage wird im allgemeinen¹ die fehlende Knöllchenbildung der fehlenden Infektion gleichgesetzt (Thornton, 1947, 1954), obwohl die Infektion selbst nur selten untersucht worden ist. Mc Coy (1932) prüft folgende nicht zu Knöllchen führende «cross inoculation groups» auf Infektionen, nämlich Klee mit Luzernebakterien, Luzerne mit Kleebakterien, Erbsen mit Kleebakterien und Erbsen mit Luzernebakterien; dabei fand sie in keiner der untersuchten Kombinationen Bakterien oder Infektionsschläuche in Wurzelhaaren (die Anzahl der untersuchten Wurzelhaare wird nicht angegeben).

Erbsen, die ich mit *Rhizobium trifolii* geimpft hatte, bildeten zwar nie Knöllchen, zeigten aber überraschenderweise Infektionen, wie sich aus Tabelle 12 ergibt. Die Feststellung wurde dadurch erleichtert, daß mit dem Phasenkontrastmikroskop die Bakterien in den Wurzelhaaren bedeutend leichter als mit dem gewöhnlichen Mikroskop gesehen werden.

Die Infektionsrate von 0,13% ist nicht signifikant verschieden von dem in Tabelle 6 dargestellten Vergleichsversuch mit Erbsen, welche mit Knöllchen hervorrufenden Rhizobien geimpft worden waren. Es wurde also ein Beispiel für die Infektion einer Leguminose durch eine nicht «passende», d.h. keine Knöllchen erzeugende Bakterienrasse gefunden.

¹ Schaede (1948) stellt fest, daß es nicht erwiesen sei, ob die Infektion überhaupt unterbleibe.

Tabelle 12

Anzahl der durch *Rhizobium trifolii* infizierten Wurzelhaare von *Pisum sativum*

Versuchsdauer: 30. August bis 30. Oktober. Die Pflanzen waren beim Impfen 17 Tage alt. Die Wurzeln bildeten während der ganzen Versuchsdauer keine Knöllchen, während zur Kontrolle gleichzeitig mit *Rhizobium leguminosarum* geimpfte Erbsen reichliche Knöllchenbildung aufweisen

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
3	507	2	0,3
4	745	1	0,1
5	610	0	0
6	620	1	0,1
9	600	0	0
	3082	4	0,13

II. Untersuchungen über die Infektion von Nichtleguminosen durch Rhizobien am Beispiel von *Helianthus annuus* L. und *Zea Mays* L.

Nachdem bei mit *Rhizobium trifolii* geimpften Erbsen festgestellt worden war, daß Leguminosen durch eine Bakterienrasse infiziert werden können, die keine Knöllchen bewirkt, war es von Interesse zu erfahren, ob Nicht-Leguminosen, deren Wurzeln bekanntlich niemals durch Rhizobien zur Knöllchenbildung angeregt werden, eventuell auch infiziert werden können. Als Untersuchungsobjekt wurden willkürlich eine Dikotyledone, *Helianthus annuus* und eine Monokotyledone, *Zea Mays* gewählt. Sonnenblumen und Mais wurden in gleicher Weise wie die Erbsen mit sterilem Wurzelsystem auf stickstoff- und kohlehydratfreier Nährlösung gezogen und 20 (Sonnenblumen) und 16 (Mais) Tage nach dem Quellen mit *Rhizobium leguminosarum* geimpft. Sowohl bei Sonnenblumen als auch bei Mais konnten in mehreren Versuchen immer wieder infizierte Wurzelhaare gefunden werden (Tab. 13 und 14.). Die zu Beginn beschriebene aseptische Aufzucht mit den strengen Sterilitätskontrollen erlaubte es, Fremdinfectionen auszuschließen, so daß die in den Wurzelhaaren gefundenen Bakterien mit den geimpften, d.h. mit *Rhizobium leguminosarum* gleichgesetzt werden dürfen. Die Infektionsrate von *Zea Mays* ist von derjenigen Knöllchen bildender Erbsen (vgl. Tabelle 7) signifikant verschieden ($1\%_{00} < P < 1\%$), während diejenige von *Helianthus annuus* keinen signifikanten Unterschied aufweist. Sonnenblumen und Mais, beide, wie schon gesagt, willkürlich gewählte Beispiele von Nicht-Leguminosen, bilden also nicht deshalb keine Knöllchen, weil die Infektion nicht stattfindet, sondern weil die mit der Infektion in den Wurzelhaaren begonnene Symbiose nicht den «normalen»,

zur Knöllchenbildung führenden Verlauf nimmt. Ob sich die Bakterien im Wurzelgewebe nicht ausbreiten oder nur ungenügend vermehren können, oder ob die Wirtspflanze auf die Bakterien nicht mit Zellteilungen reagiert, müßte, wie bei den vorher angeführten Beispielen von Infektionen ohne nachfolgende Knöllchenbildung, der Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Tabelle 13

Anzahl der durch *Rhizobium leguminosarum* infizierten Wurzelhaare von *Helianthus annuus*
Versuchsdauer: 10. September bis 20. Oktober. Die Pflanzen waren beim Impfen 20 Tage alt

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
3	466	0	0
5	180	4	2,22
7	881	0	0
9	518	3	0,57
10	1089	0	0
11	771	1	0,12
14	564	1	0,17
	4469	9	0,20

Tabelle 14

Anzahl der durch *Rhizobium leguminosarum* infizierten Wurzelhaare von *Zea Mays*
Versuchsdauer: 22. Februar bis 23. März. Die Pflanzen waren beim Impfen 16 Tage alt

Zwischen Impfen und Untersuchung verstrichene Zeit in Tagen	Anzahl der untersuchten Wurzelhaare	Anzahl der infizierten Wurzelhaare	
		Anzahl	%
4	600	1	0,16
5	700	1	0,14
6	500	0	0
7	800	2	0,25
8	800	1	0,12
11	600	0	0
12	600	0	0
13	800	0	0
14	700	0	0
15	800	2	0,25
	6900	7	0,10

5 der 7 infizierten Wurzelhaare waren an Wurzelspitzen, so daß angenommen werden darf, daß die Wurzelhaare mindestens vor der Präparation noch lebten.

Zusammenfassung

1. Die Arbeit stellte sich zur Aufgabe, festzustellen, ob aus dem Ausbleiben der Knöllchenbildung bei mit Rhizobien geimpften Pflanzen geschlossen werden darf, daß keine Infektion stattgefunden hat oder ob trotz erfolgter Infektion die Knöllchenbildung unterbleibt. Die Fragestellung setzte voraus, zunächst die Verhältnisse der Infektion bei Leguminosen unter solchen Bedingungen abzuklären, die eine reichliche Knöllchenbildung ermöglichen.
2. Es wurden die Wurzelhaare lebender, ungefärbter Wurzelstücke mit dem Phasenkontrastmikroskop auf Infektionen durch Rhizobien untersucht. Da die Identität der im Mikroskop beobachteten mit den geimpften Bakterien sicher gewährleistet sein mußte, Bakterien aber morphologisch nicht unterscheidbar sind, war die Aufzucht *steriler Wurzelsysteme* nötig, die mit *Reinkulturen* von Rhizobien zu impfen waren. Deshalb wurde eine Methode zur *aseptischen* Aufzucht der Wurzelsysteme der Versuchspflanzen ausgearbeitet, die es erlaubte, vor dem Impfen die Sterilität der Wurzeln festzustellen, so daß zufällig und ungewollt durch Mikroorganismen verunreinigte Pflanzen von der Untersuchung ausgeschlossen werden konnten.
3. Die Prüfung oberflächlich steriler Erbsen und Maiskörner auf innere Sterilität ergab, daß zirka 7 % der untersuchten Erbsen und 18 % der Maiskörner im Sameninnern infiziert waren. Deshalb war es trotz zuverlässiger äußerlicher Desinfektion notwendig, die Sterilität *aller* Pflanzen bei *jedem* Versuch zu kontrollieren.
4. Bei der Untersuchung der Infektion von *Trifolium pratense*, *Medicago sativa* und *Pisum sativum* durch Knöllchenbakterien wurden keine die Wurzelhaare durchziehenden Infektionsschläuche gefunden, während sie in Wurzelhaaren von *Trifolium subterraneum* (in bezug auf Knöllchenbildung genetisch einheitliches Material) an einzelnen Stellen des Wurzelsystems gehäuft auftraten.
5. In den Wurzelhaaren aller untersuchten, mit Rhizobien geimpften Leguminosen (*Pisum sativum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium subterraneum* und *Medicago sativa*) wurden lose, nicht durch einen Infektionsschlauch zusammengehaltene Bakterien beobachtet, die entweder Brown'sche Bewegung oder rasche Eigenbeweglichkeit zeigten.
6. Aus der Tatsache, daß lose Bakterien nicht nur in alten, sondern auch in den jüngsten, d. h. noch lebenden Wurzelhaaren hinter der Wurzelspitze gesehen wurden, ergibt sich, daß nicht etwa nur tote Wurzelhaare ohne Bildung eines Infektionsschlauches infiziert worden sind. *Jedes Wurzelhaar, in dem wenigstens ein Bakterium zu erkennen war, wurde daher als infiziert angesehen.*

7. Die Rate der infizierten Wurzelhaare war klein; sie betrug bei Erbsen zirka 0,4 %.
 8. Auf welche Weise die Knöllchenbakterien in das Innere des Wurzelhaares gelangen, ist unbekannt und konnte auch jetzt nicht festgestellt werden. Unwahrscheinlich ist die enzymatische Auflösung der Zellwand, da auch in meinen Versuchen keine Zellulose spaltenden Enzyme gefunden wurden und bis heute auch keine Pektin abbauende entdeckt werden konnten. Und doch enthalten die Wurzelhaare von Erbsen soviel kristalline Zellulose, daß sie mit einem Debey-Scherrer-Röntgendiagramm nachgewiesen werden konnte.
 9. Die Infektion der Wurzelhaare erfolgte bald nach dem Impfen: Innerhalb von 20 Stunden nach der Zugabe der Bakteriensuspension wurden bei Erbsen infizierte Wurzelhaare gefunden. Es konnte keine regelmäßige Zu- oder Abnahme der Infektionen in der Zeit zwischen Impfen und reichlicher Knöllchenbildung beobachtet werden.
 10. Nur etwa jede zweite bis dritte Infektion führte bei Erbsen zu Knöllchenbildung (s. p. 95 ff).
 11. Mit Hilfe einer Färbungsmethode, welche die Zuwachszonen der Wurzelsysteme genau abgrenzt, konnte festgestellt werden, daß sich Knöllchen nur an Wurzelteilen bilden, die *nach* dem Impfen gewachsen waren, oder an Stellen, an denen *nach* dem Impfen eine Seitenwurzel entstanden war.
 12. Wurzelsysteme junger Erbsenpflanzen, deren Sproß noch unentwickelt war, wurden *nicht* infiziert, während ältere mit etioliertem oder amputierten Sproß zwar Infektionen aber keine Knöllchen aufwiesen.
 13. Hohe Konzentrationen von Nitraten verhinderte bei Erbsen wohl die Knöllchenbildung, nicht aber die Infektion.
 14. Mit Klee Bakterien geimpfte Erbsen wurden zwar infiziert, konnten aber nicht zur Knöllchenbildung gebracht werden.
 15. *Helianthus annuus* und *Zea mays*, zwei willkürlich gewählte Beispiele von Nicht-Leguminosen, zeigten nach dem Impfen mit Knöllchenbakterien infizierte Wurzelhaare.
 16. Die angeführten Beispiele von Infektion ohne nachfolgende Knöllchenbildung zeigen, daß die Anzahl der Knöllchen kein Maß für die Infektion darstellt. Der Verlauf der Symbiose scheint von der höheren Pflanze bestimmt zu werden.
-

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* bei Herrn Prof. Dr. Max Geiger-Huber ausgeführt. Für sein Interesse an meiner Arbeit, für seine Anregungen sowie dafür, daß er mir Instrumente und Material in großzügiger Weise zur Verfügung stellte und mir erlaubte, für Serienarbeiten Hilfskräfte in Anspruch zu nehmen, möchte ich ihm herzlich danken. Weiterhin bin ich großen Dank schuldig Herrn Dr. H. Huber für die statistischen Berechnungen sowie Fräulein B. Baumgartner, Fräulein B. Brunner, Fräulein D. Jeker und Fräulein M. Löliger für ihre ausgezeichnete Hilfe bei der Aufzucht und Untersuchung der Versuchspflanzen.

Literatur

- Allen, O.N., and Allen, E.K., 1940. Response of the peanut plant to inoculation with rhizobia, with special reference to morphological development of the nodules. *Bot. Gaz.*, **102**, 121–142.
- Allen, O.N., and Allen, E.K., 1958. Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 8, 48–118. Springer, Göttingen.
- Allen, O.N. and Baldwin, I.K., 1954. Rhizobia-Legume relationships. *Soil Science*, **78**, 415–427.
- Allison, F.E., 1935. Carbohydrate supply as a primary factor in legume symbiosis. *Soil Science*, **39**, 123–143.
- Arora, N. 1954. Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. *Phytomorphology*, **4**, 211–216.
- Beijerinck, M.W., 1888. Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen. *Bot. Ztg.*, **46**, 741–804.
- Burlet, E., 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **50**, 519–544 (Diss. Basel).
- Dangeard, P.A., 1926. Recherches sur les tubercules radicaux des Légumineuses. *Le Botaniste*, **16**, 1–269.
- Diener, T., 1950. Über die Bedingungen der Wurzelknöllchenbildung bei *Pisum sativum* L., *Phytopath. Zschr.*, **16**, 129–170.
- Esau, K., 1953. *Plant anatomy*; John Wiley (New York). Chapman and Hall (London).
- Ekdahl, I., 1948. The action of chlorate and some related substances upon roots and root hairs of young wheat plants. *Ann. Agric. Coll. Sweden* **15**, 113.
(Zitiert aus: Frey-Wyssling, A., 1948. The growth in surface of the plant cell wall. *Growth Symposium*, **12**, 151–169.)
- Fähræus, G., 1957. The infection of clover root hairs by Rhizobia studied by means of a simple glass slide technique. *J. General Microbiology*, **16**, 374–381.
- Fisher, R.A., 1954. *Statistical methods for research workers*. Edinburgh ed. 12.
- Frey, R., 1950. Chitin und Zellulose in Pilzzellwänden. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **60**, 199–230.
- Frey-Wyssling, A., 1948. The growth in surface of the plant cell wall. *Growth Symposium*, **12**, 151–169.
- Frey-Wyssling, A., und Mühlethaler, K., 1949. Über den Feinbau der Zellwand von Wurzelhaaren. *Mikroskopie*, **4**, 257–266.
- Frey-Wyssling, A., und Mühlethaler, K., 1950. Bau und Funktion der Wurzelhaare. *Schweiz. Landwirtschaftl. Monatshefte*, **28**, 212–219.
- Gäumann, E., 1951. *Pflanzliche Infektionslehre*. Birkhäuser, Basel.
- Gäumann, E., Jaag, O., und Roth, S., 1945. Über einen Immunisierungsversuch mit Wurzelknöllchenbakterien bei Leguminosen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **55**, 270–277.

- Kern, H., 1956. Immunität. In: Handb. d. Pflanzenphysiologie, **2**, 826–839. Springer, Göttingen.
- Kopp, M., 1948. Über das Sauerstoffbedürfnis wachsender Pflanzenzellen. Diss. ETH, Zürich.
- Lewis, K.H., and Mc Coy, E., 1933. Root nodule formation on the garden bean by a technique of tissue culture. Bot. Gaz., **95**, 316–328.
- Ludwig, C.A., and Allison, F.E., 1935. Some factors affecting nodule formation on seedlings of leguminous plants. J. amer. Soc. agron., **27**, 895–902.
- Lundegårdh, H., 1946. The growth of root hairs. Bot. Arch., **33A**, 1–19.
- Mc Coy, E., 1929. A cytological and histological study of the root nodules of the bean, *Phaseolus vulgaris* L. Zbl. Bakt. II, **79**, 394–412.
- Mc Coy, E., 1932. Infection by *Bacterium radicicola* in relation to the microchemistry of the host's cell walls. Proc. Roy. Soc. London B, **10**, 514–533.
- Nutman, P.S., 1948. Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover. Ann. Bot., **12**, 81–96.
- Nutman, P.S., 1949. Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover Heredity, **3**, 263–291.
- Nutman, P.S., 1953. Studies on the physiology of nodule formation. IV. The mutual inhibitory effects on nodule production of plants grown in association. Ann. Bot., **17**, 95–126.
- Nutman, P.S., 1956. The influence of the legume in root-nodule symbiosis. Biological Reviews, **31**, 109–151.
- Peirce, G.I., 1902. The root tubercles of burr clover (*Medicago denticulata* Willd.) and of some other leguminous plants. Calif. Acad. Sci. Proc. 3d Ser. Botany, **2**, 295–328 (aus Bond L. 1948, Origin and developmental morphology of root nodules of *Pisum sativum*. Bot. Gaz., **109**, 411).
- Prazmowski, A., 1890. Die Wurzelknöllchen der Erbse. Landwirtschaft. Versuchs-Stat., **37**, 161–238.
- Priestley, H.H., 1943. The cuticle in angiosperms. Botanical Review, **9**, 593–616.
- Rippel-Baldes, R., 1952. Grundriß der Mikrobiologie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Rudin, P., 1956. Versuche zur Physiologie der Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L. Phytopath. Zschr. **26**, 57–80 (Diss. Basel).
- Schaede, R., 1940. Die Wurzelknöllchen der adventiven Wasserwurzeln von *Neptunia oleracea* und ihr Bakteriensymbiose. Planta, **31**, 1–21.
- Schaede, R., 1944. Untersuchungen an den Wurzelknöllchen von *Vicia faba* und *Pisum sativum*. Beitr. z. Biol. Pfl., **27**, 165–188.
- Schaede, R., 1948. Die pflanzlichen Symbiosen. Gustav Fischer, Jena.
- Schäfer, A.C., 1957. Über Bildung und Wirkung eines zellulosespaltenden Fermentes aus Schimmelpilzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **67**, 218–270 (Diss. Basel).
- Stolp, H., 1952. Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. Archiv f. Mikrobiologie, **17**, 1–29.
- Thimann, K.V., 1936. On the physiology of the formation of nodules on legume roots. Proc. Nat. Acad. Sci., **22**, 511–514.
- Thimann, K.V., 1939. The physiology of nodule formation. Transactions of third Commission of international Society of soil science. **A**, 24–28.
- Thornton, H.G., 1929a. The influence of the number of nodule bacteria applied to the seed upon nodule formation in legumes. J. agric. Sci., **19**, 373–381.
- Thornton, H.G., 1929b. The rôle of the young lucerne plant in determining the infection of the root by the nodule-forming bacteria. Proc. Roy. Soc. B, **104**, 481–492.

- Thornton, H.G., 1930a. The early development of the root nodule of lucerne (*Medicago sativa* L.), *Annals of Bot.*, **44**, 385-391.
- Thornton, H.G., 1930b. The influence of the host plant in inducing parasitism in lucerne and clover nodules. *Proc. Roy. Soc. B*, **106**, 110-122.
- Thornton, H.G., 1936. The action of sodium nitrate upon the infection of Lucerne root-hairs by nodule bacteria. *Proc. Roy. Soc. B.*, **119**, 474-492.
- Thornton, H.G., 1947. The biological interactions of *Rhizobium* to its host legume. *Antonie van Leeuwenhoek*, **12**, 85-95.
- Thornton, H.G., 1954. The nodule bacteria and their host legumes: some problems that they still present. *Science Progress*, **42**, 185-204.
- Thornton, H.G., und Nicol, H., 1936. Reduction of nodule numbers and growth produced by the addition of sodium nitrate to lucerne in sand culture. *J. Agric. Sci.*, **26**, 173-188.
- Virtanen, A.I., 1947. The biology and chemistry of N-fixation by legume bacteria. *Biological Reviews*, **22**, 239-269.
- Virtanen, A.I., Jorma, I., Linkola, H., und Linnasalmi, A., 1947. On the relation between N-fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules. *Acta chemica Scandinavica*, **1**, 90-110.
- Wilson, I.K., 1917. Physiological studies of *Bacillus radicum* of soybean (*Soja max* Piper) and of factors influencing nodules production. *Cornell Univ. Agr. Expt. Sta. Bull.*, **386**, 369-413. (Zitiert aus: Thornton und Nicol, 1936.)
- Wilson, I.K., 1931. Nodule production on etiolated vetch seedlings. *Phytopathology*, **21**, 1083-1085.
- Wilson, P.W., Fred, E.B., and Salmon, M.R., 1933. Relation between CO₂ and elemental N-assimilation in leguminous plants. *Soil Science*, **35**, 145-165.
- Wipf, L., und Cooper, D.C., 1940. Somatic doubling of chromosomes and nodular infection in certain Leguminosae. *A. J. Bot.*, **27**, 821-824.
-

Curriculum vitae

Am 19. September 1929 wurde ich, Annemarie Bürgin-Wolff, als Tochter von Robert Wolff, Dr. jur., Advokat und Notar, und von Ella, geb. Kromer, in Basel geboren. Ich durchlief die Schulen in Basel, bestand am Mädchengymnasium die Maturität (Typus B) und studierte an der Universität Basel Chemie, Zoologie und Bakteriologie-Hygiene als Nebenfächer, Botanik als Hauptfach. Während ich an meiner Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Max Geiger-Huber arbeitete, war ich bis zu meiner Verheiratung Assistentin am Botanischen Institut. Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse folgender Professoren und Dozenten: R. Abderhalden, E. Batschelet, E. Berger, E. Bonjour, M. Brenner, R. Brückner, A. Bühler, H. Erlenmeyer, J. Gantner, M. Geiger-Huber, R. Geigy, E. Handschin, H. Hediger, E. Heitz, P. Huber, K. Jaspers, R. Laur, E. Mahler, H. Mislin, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, M. Reiff, H. Reinhardt, O. Schüepp, J. Tomseik, W. Vischer, F. Verzar, A. von Salis.

Meinen verehrten Lehrern spreche ich den herzlichsten Dank aus.

